

Mechanismus und anwendungsbezogene Optimierung von Channelrhodopsin-2

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herr Dipl.-Biophys. André Berndt, geb. Kaschade

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter Hegemann
2. Priv.-Doz. Dr. Franz Bartl
3. Prof. Dr. Thomas Friedrich

Tag der mündlichen Prüfung: 12.7.2011

Für Alex

denn ohne Dich wäre vieles nicht möglich gewesen

Zusammenfassung

Channelrhodopsin-2 ist ein lichtaktivierter Kationenkanal, der zur nichtinvasiven Steuerung neuronaler Aktivität verwendet wird. Einige grundlegende Eigenschaften dieses Proteins sind bereits bekannt, aber die molekularen Mechanismen des Ionentransports und der Aktivierung liegen noch weitgehend im Dunkeln.

Ziel dieser Studie war es, anhand von Mutationsstudien die Funktion einzelner Aminosäuren zu bestimmen. Dazu habe ich gezielt potentiell wichtige Reste substituiert und die Channelrhodopsin-2-Varianten elektrophysiologisch untersucht. Um die aufgetretenen Änderungen beim Ionentransport und den Kanalkinetiken zu erklären, habe ich verschiedene mathematische Modelle an die experimentellen Daten angepasst. Dabei stellte sich heraus, dass die Reste H134 und E90 Schlüsselpositionen für den Protonentransport sind. Außerdem haben auch die Reste E235 und D253 einen großen Einfluss auf den Ladungstransport. Dagegen wird die Kanalöffnung von C128 und D156 kontrolliert. Des Weiteren kontrolliert E123 die Übergänge zwischen leitenden und nichtleitenden Zuständen von Channelrhodopsin-2.

Aus der zielgerichteten Mutation von Aminosäuren resultierten Varianten, die langsamere oder schnellere Kinetiken hatten oder eine bessere Expression zeigten als der Wildtyp. Das Anwendungspotential der modifizierten Kanäle wurde in Kooperationen mit neurophysiologischen Arbeitsgruppen untersucht. Dadurch konnten drei neue Typen von Channelrhodopsinen in die Neurophysiologie eingeführt werden. Die *step-functions opsins* führen zu einer anhaltenden Membrandepolarisation, die die Erregbarkeit von Neuronen gegenüber synaptischen Inputs erhöht. ChETA erlaubt das zeitlich präzise Auslösen von Aktionspotentialen auch bei sehr hohen Anregungsfrequenzen. T159C und E123T/T159C ermöglichen durch ihre großen Photoströme und optimierten Kinetiken eine hohe Zuverlässigkeit bei der optischen Steuerung neuronaler Aktivität. Dadurch wird das Anwendungsspektrum von Channelrhodopsin-2 erheblich erweitert.

Abstract

Channelrhodopsin-2 is a light-activated cation channel which has become a very useful tool in neurophysiology, since it allows the noninvasive control of neural activity. Some of the basic features of this channel are known from previous studies, but the molecular mechanisms of ion translocation and activation are largely unknown.

The aim of my thesis is to elucidate the function of single amino acids by mutational studies. I replaced potentially important residues and probed the constructs by electrophysiological measurements under various conditions. Additionally, I fitted the experimental data to several mathematical models in order to explain changes in ion permeabilities and channel kinetics and I assigned particular functions to the mutated residues. Apparently, H134 and E90 are key positions for the proton transportation. Mutations at E235 and D253 also strongly influence ion translocation, whereas C128 and D156 obviously control the channel opening. Moreover, I found that E123 is a key element for the channel activation which controls the transitions between conducting and non-conducting states of Channelrhodopsin-2.

The genetically modified Channelrhodopsin-2-variants provide several favorable features, such as, a slower or faster channel opening and closing or an optimized expression. Therefore, we tested the potential of promising constructs for applications in collaboration with neurophysiology laboratories. Finally, we introduced three new tools. First, step-function opsins induce a sustained membrane depolarization which sensitizes neurons to native synaptic inputs. Second, the ChETA variant allows the temporally precise generation of action potentials even at high stimulation frequencies. Third, T159C and E123T/T159C provide large photocurrents and optimized kinetics resulting in an improved performance in the noninvasive control of neural activity. In summary, this significantly broadens the range of application for channelrhodopsin-2.

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels

Berndt, A., Schoenenberger, P., Mattis, J., Tye, K. M., Deisseroth, K., Hegemann, P., Oertner, T. G.; *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011)

The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T

Stehfest, K., Ritter, E., Berndt, A., Bartl, F., Hegemann, P.; *Journal of molecular biology* (2010)

Two open states with progressive proton selectivities in the branched channelrhodopsin-2 photocycle

Berndt, A., Prigge, M., Gradmann, D., Hegemann, P.; *Biophysical journal* (2010)

Ultrafast optogenetic control

Gunaydin, L. A., Yizhar, O., Berndt, A., Sohal, V. S., Deisseroth, K., Hegemann, P.; *Nature Neuroscience* (2010)

Bi-stable neural state switches

Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L. A., Hegemann, P., Deisseroth, K.; *Nature neuroscience* (2009)

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Bakteriorhodopsin als Modellsystem.....	2
1.2 Channelrhodopsin-2 in der Forschung.....	4
1.2.1 Grundlegende Charakterisierung.....	4
1.2.2 Channelrhodopsin-2 als Werkzeug in der Optogenetik	9
1.3 Zielsetzung und Forschungsansatz.....	11
2. Material und Methoden	13
2.1 <i>Xenopus laevis</i> Oocyten.....	13
2.2 Molekularbiologisches Material.....	13
2.2.1 Ausgangsvektor und Primer für die Mutagenese	13
2.2.2 Medien zur Inkubation von Oocyten und <i>E. coli</i>	14
2.2.3 DNA und RNA Gelelektrophorese.....	15
2.2.4 Kits	15
2.3 Technische Hilfsmittel.....	16
2.3.1 Geräte für die molekularbiologische Arbeit.....	16
2.3.2 Geräte für die elektrophysiologischen Messungen (TEVC)	17
2.3.3 Software	18
2.4 mRNA Präparation	18
2.4.1 Mutagenese der ChR2-WT DNA-Sequenz	18
2.4.2 <i>E. coli</i> Transformation durch Hitzeschock	19
2.4.3 Isolierung der Plasmide aus <i>E.coli</i>	19
2.4.4 Transkription der mRNA.....	20
2.4.5 ChR2 Expression in <i>Xenopus</i> oocyten	20
2.5 TEVC Messung	21
2.5.1 Herstellung der Mikroelektroden.....	21
2.5.2 Experimenteller Aufbau.....	21
2.5.3 Messvorbereitung	23
2.5.4 Durchführung der TEVC-Experimente.....	23
2.6 Modellierung von IV-Kurven und Stromspuren	29
2.6.1 Modellierung der IV-Kurven mit dem <i>Two Barrier</i> Modell	29
2.6.2 Modellierung der Photoströme mit einem 4-Zustandsmodell	29

2.7 Elektrophysiologische Messungen an Neuronen	30
3. Ergebnisse	33
3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von <i>ChR2-WT</i>	33
3.1.1 Strom/Spannungskurven von verschiedenen ionalen Bedingungen	33
3.1.2 Umkehrpotentiale von I_s und I_0	35
3.1.3 Einwärtsgleichrichtung des Ladungstransports.....	36
3.1.4 <i>Recovery</i> Kinetik des transienten Stroms.....	37
3.1.5 ChR2 Kinetiken bei Anregung mit Lichtpulsen.....	38
3.1.6 Schnelle Kinetiken nach Nanosekunden-Laserblitzaktivierung.....	39
3.1.7 Leitung bivalenter Kationen	41
3.1.8 Transport von Kaliumionen durch ChR2.....	44
3.1.9 Strom/Spannungsmessung mit variierender Chloridkonzentration	44
3.2 Charakterisierung von <i>E90 Mutationen</i>	45
3.2.1 E90Q	45
3.2.2 E90D	49
3.2.3 E90H.....	50
3.2.4 E90K.....	52
3.2.5 E90A.....	53
3.2.6 E90L	54
3.2.7 K93Q.....	55
3.2.8 Aktionsspektren von E90X und K93Q	55
3.3 Charakterisierung von <i>H134 Mutationen</i>	56
3.3.1 H134R.....	56
3.3.2 H134D	59
3.3.3 H134N	61
3.3.4 H134S	64
3.3.5 H134F	66
3.4 Charakterisierung von <i>E123 Mutationen</i>	67
3.4.1 E123Q.....	67
3.4.2 E123D	70
3.4.3 E123T.....	74
3.3.4 E123A.....	78
3.4.5 E123L	82

3.5 D253 Mutationen und E235Q.....	82
3.5.1 D253N	82
3.5.2 D253E	83
3.5.3 E235Q.....	84
3.6 T159 Mutationen und T159C Derivate.....	84
3.6.1 Basischarakterisierung von T159C	85
3.6.2 In vitro Optogenetik mit T159C in Hippocampusneuronen.....	89
3.6.3 Vergleich von ChR2-WT und H134R mit T159C Derivaten	90
3.6.4 Basischarakterisierung T159C/E123T	92
3.6.5 T159M	94
3.7 Step-function opsins: C128 und D156 Mutationen	96
3.7.1 C128T	97
3.7.2 C128A	100
3.7.3 C128S.....	102
3.7.4 D156N	104
3.7.5 D156A und C128S/D156A	104
3.8 Tabellarische Zusammenfassung und Statistik.....	106
3.8.1 Strom/Spannungskurven	106
3.8.2 Kinetiken der Stromspuren während und nach Anregung mit Lichtpulsen	110
3.8.3 Kinetiken der Stromspuren nach Laserblitzanregung	115
3.8.4 Kinetiken der <i>step-function opsins</i>	116
4. Diskussion.....	118
4.1 Der Mechanismus von ChR2-WT.....	118
4.1.1 Ionenleitung in ChR2-WT.....	118
4.1.2 Two Barrier Modell des Ionen transports.....	122
4.1.3 Charakterisierung von zwei leitenden Zuständen	129
4.1.4 Two Barrier Modell für ChR2-WT	134
4.1.5 Modellierung der Kanalkinetiken	137
4.1.6 pH _e - und Spannungsabhängigkeit der ChR2-WT Kinetiken....	141
4.2 Funktion von Aminosäuren im ChR2 Mechanismus	146
4.2.1 H134 als potentieller Transmitter des Protonenstroms	146
4.2.2 E123 spielt eine zentrale Rolle bei allen Zustandsänderungen.....	155
4.2.3 D253 ist essentiell für die Kanalaktivierung und den Ladungstransport	165

4.2.4 E235 als extrazellulär gelegene Ionenbindungsstelle	167
4.2.5 E90 ist ein zentraler Bestandteil des Protonentransports	168
4.2.6 C128 und D156 steuern die Öffnung und das Schließen des Kanals	175
4.2.7 Zusammenhang zwischen dem Photozyklus und dem 4-Zustandsmodell	184
4.2.8 Ionentransport und Aktivierung in ChR2 und die Rolle einzelner Aminosäuren	185
4.2.9 Tabellarische Zusammenfassung der Modellparameter	186
4.3 Die Anwendung von ChR2 Mutationen in der Optogenetik	187
4.3.1 Step-function opsins erhöhen die Erregbarkeit von Neuronen.....	188
4.3.2 ChETA erhöht die Zuverlässigkeit optisch gesteuerter, neuronaler Aktivität	190
4.3.3 T159C liefert große Photoströme in Neuronen	192
4.4 Ausblick	195
Anhang	198
<i>Two Electrode Voltage Clamp</i>	198
<i>Primer für site directed mutagenesis</i>	202
<i>Mathematica Programmcodes</i>	203
<i>3- und 1-Buchstabencode der proteinogenen Aminosäuren</i>	208
<i>Abkürzungen</i>	209
<i>Tabellenverzeichnis</i>	210
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	211
<i>Literaturverzeichnis</i>	217
<i>Danksagung</i>	225
<i>Eigenständigkeitserklärung</i>	227

1. Einleitung

Channelrhodopsin-2 (ChR2) ist ein Membranprotein aus der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und gehört zur Klasse der mikrobiellen Rhodopsine [1], die in der Natur in verschiedensten Organismen eine Vielzahl von Funktionen ausüben. Der bekannteste Vertreter dieser Klasse ist die lichtgetriebene Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) aus dem Archaeon *Halobacterium salinarum*. Dabei handelt es sich um eines der bestuntersuchten Membranproteine überhaupt [2]. Bei den Halobakterien finden sich auch die lichtgetriebene Chloridpumpe Halorhodopsin und die Photorezeptoren Sensory Rhodopsin I und II, die ebenfalls zu den mikrobiellen Rhodopsinen gehören [3,4]. Bei marinen Proteobakterien wurde außerdem das zu BR homologe Proteorhodopsin identifiziert [5]. Trotz ihrer funktionellen Unterschiede haben diese Proteine eine ähnliche Struktur. Ihr membranständiger Teil umfasst 7 α -Helices, die ein kovalent gebundenes Retinalmolekül als Chromophor tragen. Im Unterschied zu den Typ II Rhodopsinen, zu denen auch die humanen Photorezeptoren der Retina gehören, befindet sich das Retinalmolekül bei den mikrobiellen Rhodopsinen im Grundzustand in *all-trans* Konfiguration. Diese Eigenschaften teilt Channelrhodopsin-2 mit anderen Vertretern dieser Klasse [6]. Die Besonderheit liegt hier in der Funktion des Proteins, nach der Lichtaktivierung passiv Ionen über die Zellmembran von *Chlamydomonas* zu leiten. Die Proteinsequenz von ChR2 umfasst 737 Aminosäuren, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Kanalfunktion vollständig in der rhodopsinähnlichen Membrandomäne lokalisiert ist (1-315) [1]. Die Reste 316-737 bilden eine c-terminale, cytosolische Domäne, die eventuell regulatorische Funktionen ausübt. Daneben wurden in *Chlamydomonas* ein weiteres Channelrhodopsin (ChR1) [7] sowie enzymgekoppelte Rhodopsine identifiziert [8]. Während über deren Funktion bislang nur spekuliert werden kann, konnten ChR1 und ChR2 eindeutig als im sogenannten *eyespot* lokalisierte Photorezeptoren identifiziert werden, die die lichtabhängigen Bewegungen (Phototaxis) von *Chlamydomonas* steuern [9,10]. Die durch die Channelrhodopsine ausgelöste Membrandepolarisation kontrolliert die Flagellenbewegung bei hohen Lichtintensitäten direkt. Bei niedrigen Intensitäten ist die Depolarisation nur schwach und der Einstrom von Ladungsträgern wie z.B. Calcium setzt vermutlich eine verstärkende Signalkaskade in Gang. Jedenfalls scheinen Channelrhodopsine verbreitete Photorezeptoren in Photosynthese betreibenden Grünalgen zu sein, da analoge Proteine auch in *Volvox* und *Dunaliella* vorkommen [11].

Für die Grundlagenforschung ist ChR2 deshalb interessant, weil es viele strukturelle Eigenschaften mit Bakteriorhodopsin teilt, aber eine gänzlich andere

Funktion ausübt. Hier stellt sich die Frage, welche Veränderungen den Unterschied zwischen einer Protonenpumpe und einem Kanal ausmachen. Über die Struktur und den Mechanismus von BR sind sehr viele Details bekannt. Daher werde ich nachfolgend einen kurzen Überblick über dieses Protein geben.

1.1 Bakteriorhodopsin als Modellsystem

BR pumpt Protonen entgegen eines pH-Gradienten aus dem Cytoplasma nach außen [12]. Die Stöchiometrie dieses Vorgangs ist praktisch 1:1, da pro absorbiertem Photon ein Proton transportiert wird. Die Amplitude des Protonenstroms ist spannungs- und pH_e -abhängig, wobei dieser immer auswärts gerichtet ist [13]. Diese Unidirektionalität wird durch den molekularen Aufbau von BR selbst festgelegt. Das aktive Zentrum ist das Retinal mit seinem sogenannten komplexen Gegenion (Abb. 1.1) [14]. Hier ist der Chromophor über eine Schiffbase mit Lysin 216 verbunden. Im Grundzustand ist die Schiffbase protoniert und positiv geladen. Als elektrostatischer Gegenpol befinden sich in unmittelbarer Nähe zwei deprotonierte und negativ geladenen Aspartate (D85, D212). Zum komplexen Gegenion gehört auch ein wohlgeordnetes Wassermolekül, das je eine Wasserstoffbrückenbindung zur Schiffbase und zu den beiden Aspartaten ausbildet, die dadurch stabilisiert werden.

BR durchläuft einen Photozyklus, bei dem sich Intermediate mit verschiedenen Absorptionsmaxima unterscheiden lassen (Abb. 1.2) [15]. Im Dunkeln liegt das Retinal hauptsächlich in *all-trans*-15-*anti* Konfiguration vor. Unmittelbar nach der Absorption eines Photons kommt es zu einer positiven Ladungsverschiebung von der Schiffbase in Richtung des β -Iononringes und damit zur Polarisierung des Retinals [16]. Dadurch wird vermutlich die Isomerisierung der Bindung zwischen den Retinalkohlenstoffatomen C13 und C14 von *trans* zu *cis* induziert [17]. Als Konsequenz sinkt der pK Wert der Schiffbase, während sich der pK Wert von D85 erhöht. Dadurch wird die Abgabe des Protons von der Schiffbase an D85 induziert (Abb. 1.3). Im nächsten Schritt entlässt die sogenannte *proton release group* (S193, E194, E204) ein Proton auf der extrazellulären Seite (L \rightarrow M Übergang) [18].

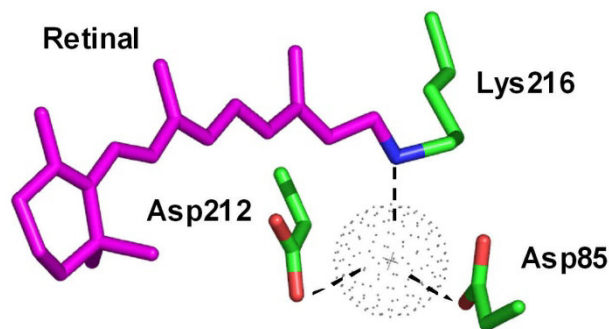


Abb. 1.1 Struktur des aktiven Zentrums von BR im Grundzustand. Retinal (magenta) ist mit Lys216 über eine protonierte Schiffbase kovalent verbunden (blau). Asp85 und Asp212 sind im Grundzustand deprotoniert und negativ geladen. Ein H_2O Molekül (grau) stabilisiert die Struktur über H-Brücken (gestrichelte Linien). (pdb: 1C3W, [14])

Die Schiffbase klappt zur cytoplasmatischen Seite um und wird durch D96 reprotoniert ($M \rightarrow N$), das anschließend ein Proton aus dem Cytoplasma aufnimmt ($N \rightarrow O$). Bei diesem Schritt erfolgt auch die thermische Reisoomerisierung des Retinals zurück in die *all-trans* Konfiguration. Im letzten Schritt deprotoniert D85, wobei das Proton über R82 an die *proton release group* weitergeleitet wird. Damit ist der Grundzustand wieder hergestellt.

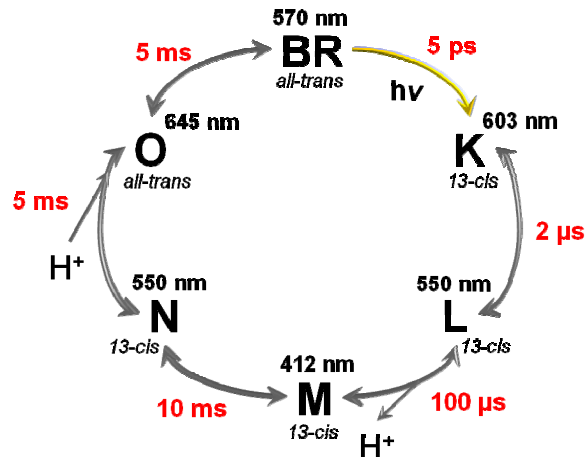


Abb. 1.2 Photozyklus von Bakteriorhodopsin. Über den Bezeichnungen für die Intermediate stehen die Wellenlängen ihrer jeweiligen Absorptionsmaxima. Darunter ist die Retinalkonfiguration angegeben. Die Zeitangaben (rot) beziehen sich auf die Zeitkonstanten der Übergänge. Der Photozyklus startet mit der Absorption von Licht ($h\nu$) und der Retinalisomerisierung. Während des $L \rightarrow M$ Übergangs gibt BR auf extrazellulärer Seite ein Proton ab und nimmt in $N \rightarrow O$ ein Proton aus dem Cytoplasma auf. (nach [15])

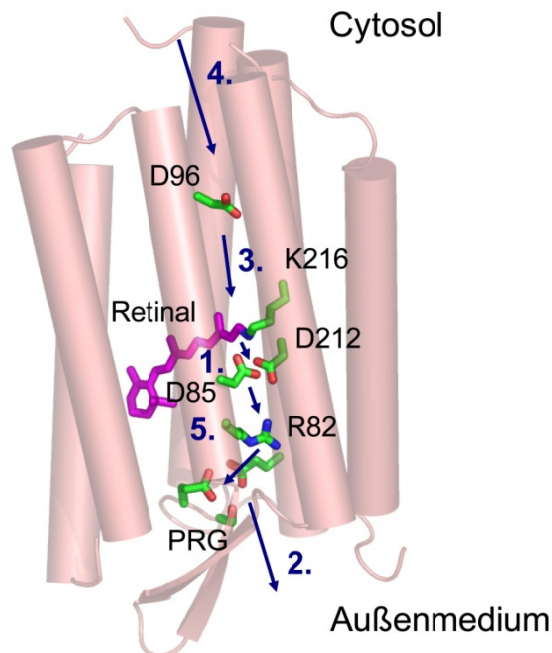


Abb. 1.3 Die Schritte des Pumpmechanismus von Bakteriorhodopsin. Das komplexe Gegenion ist durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen mit der *proton release group* (PRG) verknüpft. 1. Als erster Schritt des sequentiellen Protonentransports erfolgt zunächst die Abgabe eines Protons von der Schiffbase an D85. 2. Von der PRG wird ein Proton ins Außenmedium abgegeben. 3. Die Schiffbase wird von D96 reprotoniert. 4. Aufnahme eines Protons aus dem Cytosol und Reprotonierung von Asp96. 5. Deprotonierung von Asp85 und Abgabe eines Protons an die PRG über Arg82. (pdb: 1C3W, [14])

1.2 Channelrhodopsin-2 in der Forschung

1.2.1 Grundlegende Charakterisierung

Prinzipiell ist die Untersuchung von ChR2 auch in *Chlamydomonas reinhardtii* möglich und notwendig, insbesondere mit Hinblick auf seine native Funktion [19]. Dagegen müssen Untersuchungen zu seinem molekularen Mechanismus unter Bedingungen stattfinden, bei denen die ChR2 Signale eindeutig vom Hintergrund unterschieden werden können.

Die ersten Experimente hierzu waren elektrophysiologische Studien, bei denen der Kanal heterolog in HEK-Zellen und Oocyten exprimiert wurde [1]. Dies war möglich, weil kurz zuvor die DNA-Sequenzen von ChR1 und ChR2 in einer Gendatenbank von *Chlamydomonas* identifiziert werden konnte [20]. Bei den elektrophysiologischen Messungen wurden die Zellen mit Licht angeregt und gleichzeitig der auftretende Ladungstransport über die Zellmembran gemessen. Der von ChR2 geleitete Strom konnte leicht identifiziert werden, da HEK-Zellen und Oocyten keine endogenen, lichtaktivierten Transporter synthetisieren. Bei diesen Studien wurden grundlegende Transporteigenschaften von ChR2 entdeckt und mit *Voltage Clamp* Messungen quantifiziert. Dabei wird die Zellmembran auf eine gleichbleibende Spannung fixiert und der Transmembranstrom gemessen. Dessen Amplitude und Richtung hängt von den elektrochemischen Gradienten ab, also der Spannung und den Ionenkonzentrationen beiderseits der Membran. So fand man heraus, dass ChR2 ein nicht selektiver Kationenkanal ist, der nach Lichtaktivierung Protonen, K^+ , Li^+ , Na^+ aber auch Ca^{++} passiv über die Membran leitet. Dabei ist die Selektivität für Protonen gegenüber Na^+ ungefähr $1 \cdot 10^6$ -mal höher. Allerdings spielen Protonenströme bei neutralen pH-Werten nur eine untergeordnete Rolle. Beträgt die Konzentration von Natrium- oder Kaliumionen 100 mM und ist die Calciumkonzentration klein, sind monovalente Kationen die Hauptladungsträger des sogenannten Photostroms.

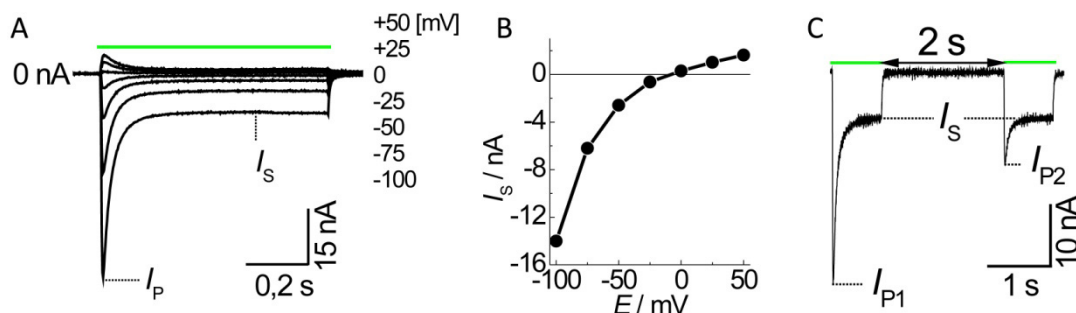


Abb. 1.4 Eigenschaften von ChR2 in Voltage Clamp Messungen. **A** Typische Photostrome in Oocyten von *Xenopus laevis* bei verschiedenen Spannungen (-100 mV bis +50 mV). Bei der Anregung (grüner Balken) steigt der Betrag des Photostroms auf ein transientes Level (I_P) und nimmt auf ein niedrigeres stationäres Level (I_S) ab. Negative Amplituden kennzeichnen den Einstrom von positiven Ladungsträgern und positive deren Ausstrom. **B** Auftragung von I_S gegen die angelegte Spannung (E). Der Einstrom ist bei negativen Spannungen am größten und nimmt bei positiveren Spannungen ab. **C** Typischer Photostrom bei Anregung mit zwei Lichtpulsen (grün). Zwischen ihnen liegen 2 Sekunden Pause. Klar erkennbar ist, dass I_S unverändert bleibt, während I_P beim zweiten Puls kleiner wird.

Außerdem fand man heraus, dass Chr2 ein Einwärtsgleichrichter ist. Das bedeutet, dass der Ausstrom kleiner ist als der Einstrom bei gleich starken aber entgegengesetzten elektrochemischen Gradienten. In den Strom/Spannungskurven, bei denen die Stromamplituden gegen die angelegte Spannung aufgetragen werden, kann man diese Eigenschaft an der Abflachung der Kurven in Richtung positiver Spannung ablesen (Abb. 1.4 B).

Die Stromamplituden sind zudem von den Wellenlängen des Anregungslichtes abhängig. In vielen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Anregungsmaximum von Chr2 bei ungefähr 470 nm liegt [1,21,22].

Wird der Kanal mit einem kontinuierlichen Lichtpuls angeregt, lässt sich der Ladungstransport in zwei Phasen unterteilen (Abb. 1.4 A). Zunächst steigt der Strom innerhalb weniger Millisekunden auf ein transientes Level (I_p) und fällt etwas langsamer auf ein niedrigeres stationäres Niveau ab (I_s). Nach Beendigung der Lichtapplikation geht der Photostrom mit einer biexponentiellen Kinetik innerhalb weniger Millisekunden auf null zurück. Des Weiteren gibt es noch eine sehr langsame Kanalkinetik, die den transienten Strom betrifft. Appliziert man zwei Lichtpulse unmittelbar hintereinander, dann ist die Amplitude des transienten Stroms beim zweiten Puls kleiner als beim ersten (Abb. 1.4 C). Je länger die Pause zwischen den Pulsen andauert, umso größer wird I_p bei der zweiten Anregung. Bei neutralen pH-Werten beiderseits der Membran erholt sich I_p innerhalb einer Minute vollständig. Zudem stellte man bereits bei den ersten elektrophysiologischen Messungen fest, dass die Kanalkinetiken spannungs- und pH-abhängig sind, allerdings wurden hierzu keine quantitativen Analysen durchgeführt [1].

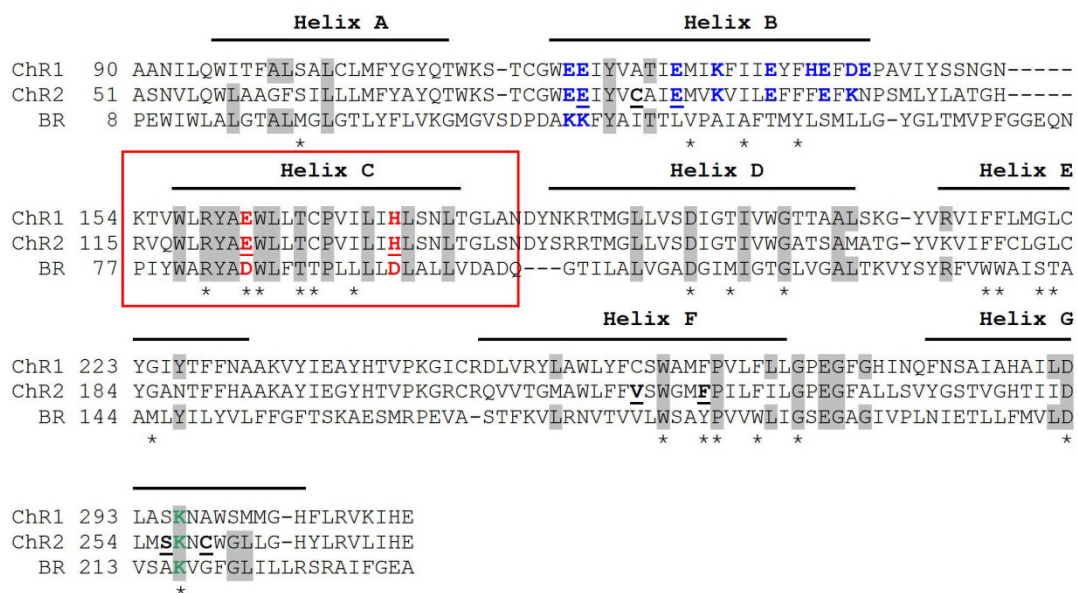


Abb. 1.5 Proteinsequenzvergleich von BR, Chr1 und Chr2. Homologe Reste sind grau hinterlegt. BR-Helices sind durch Linien gekennzeichnet. Reste die in BR mit Retinal interagieren sind durch einen Stern gekennzeichnet. Der grün hervorgehobene Lysinrest bildet mit Retinal eine Schiffbase. Größte Übereinstimmung findet sich im Bereich des komplexen Gegenions (roter Kasten). D85 und D96 sind für die BR Funktion entscheidend. Hier gibt es bei Chr2 Substitutionen gegen Glutamat (E123) und Histidin (H134). Besonders auffällig ist die erhöhte Anzahl geladener Reste (blau) in der potentiell zweiten Chr-Helix. (Alignment nach [23])

Der Vergleich der Proteinsequenzen von ChR2 mit BR enthüllt einige Übereinstimmungen, die auf strukturelle und eventuell funktionelle Gemeinsamkeiten schließen lassen (Abb. 1.5). Daher konnte auch eine relativ gesicherte Homologiestruktur von ChR2 auf Basis von Röntgenkristalldaten von BR erstellt werden [23]. Eine hohe Homologie liegt bei Aminosäuren vor, die sich in unmittelbarer Nähe zum Retinal befinden. An der Stelle von BR-D85 und BR-D212 befinden sich in ChR2 beispielsweise die ebenfalls geladenen Reste E123 und D253. Deshalb liegt in ChR2 vermutlich ebenfalls ein komplexes Gegenion vor. Die ersten Mutationsstudien an ChR2-E123 ergaben signifikant reduzierte Photoströme, so dass die Autoren vermuteten, dass dieser Rest eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Kanals spielt [1]. Zudem wurde bei spektroskopischen Messungen im UV/vis Bereich festgestellt, dass es bei ChR2 wie bei BR nach der Lichtanregung zu einer Deprotonierung der Schiffbase kommt [22,24]. Die gleichen Resultate ergaben zuvor auch die ersten spektroskopischen Untersuchungen am aufgereinigten *Volvox*-Channelrhodopsin [25].

Aus der Abfolge der identifizierbaren Intermediate konnte ein Photozyklus für ChR2 abgeleitet werden (Abb. 1.6). Dazu erfolgte zunächst die Untersuchung aufgereinigter und in Detergenzien gelöster Proteine durch Blitzlichtphotolyse. Nach der Aktivierung entsteht innerhalb von Nanosekunden ein Intermediat mit einem rotverschobenen Absorptionsmaximum (P500). Daraus geht mit einer Zeitkonstante von 25 μ s ein deutlich blauverschobenes Intermediat (P390) hervor. Solche starken Blauverschiebungen werden bei Rhodopsinen durch die Deprotonierung der Schiffbase verursacht. Dem folgt die Entstehung einer rotverschobenen Spezies (P520) mit einer reprotonierten Schiffbase. Dieser Übergang hat eine ähnliche Kinetik wie die Öffnungskinetik von ChR2 aus den elektrophysiologischen Untersuchungen. Daher wird dieses Intermediat als der leitende Zustand betrachtet. Gestützt wird diese These durch die Zerfallskinetik von P520, die in der Größenordnung der *off*-Kinetik der Photoströme liegt.

Während die ChR2 Kinetiken am Anfang des Photozyklus in der Größenordnung der ebenfalls schnellen BR Kinetiken liegen, sind die Übergänge zwischen den späten ChR2 Intermediaten sehr viel langsamer. Diese konnten mit konventionellen Photometern und FTIR Messungen beobachtet werden [22]. Nach P520 geht der Kanal in die Intermediate P480_a und P480_b über, die eine Zerfallskinetik im Sekundenbereich haben. Diese Kinetik korreliert mit der langsamen Erholung des transienten Stroms (Abb. 1.4. C). Daraus ist ersichtlich, dass diese Intermediate nicht leiten. Die FTIR Messungen ergaben noch einen weiteren Unterschied zu BR. Bei ChR2 konnte man eine relativ starke Amid I Bande in den FTIR Differenzspektrum aus den mit Licht angeregten Zuständen und dem Grundzustand beobachten. Daher geht man bei ChR2 davon aus, dass es während des Photozyklus zu größeren strukturellen Änderungen kommt als bei BR.

Baman et. al fanden heraus, dass bei einer kontinuierlichen Anregung von ChR2 mit blauem Licht (473 nm) und gleichzeitiger Applikation von grünem Licht (544 nm) der Kanal schnell geschlossen wird [24]. Sie vermuteten daher, dass es eine schnelle photochemische Konversion vom leitenden Zustand (P520) zurück in den

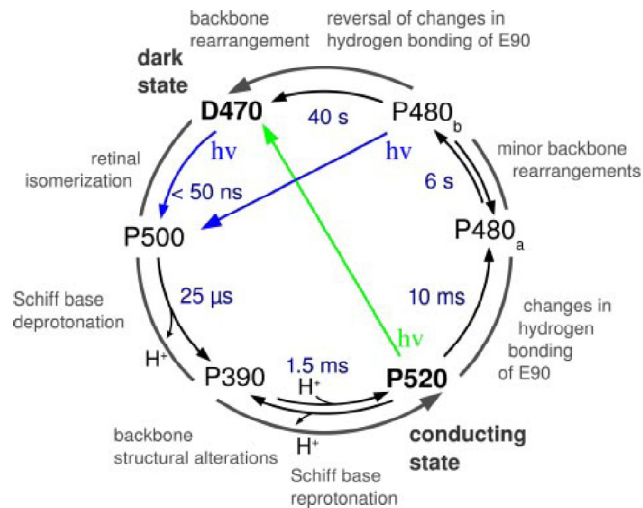


Abb. 1.6 Photozyklus von ChR2. Die Namen der Intermediate richten sich nach den Wellenlängen ihrer Absorptionsmaxima. Zudem sind die Zeitkonstanten für die jeweiligen Übergänge angegeben. Farbige Pfeile stellen Photokonversionen dar und schwarze Pfeile thermische Übergänge. D470 ist der Grundzustand und P520 wird als leitender Zustand betrachtet. Grau: Ereignisse die während des Zyklus auf molekularer Ebene stattfinden. Nähere Erläuterungen im Text. (Entnommen aus [22])

Grundzustand gibt. Obwohl Einigkeit darüber herrscht, dass es nach der Lichtanregung zur Isomerisierung des Retinals kommt, ist nicht klar bei welchem Übergang die Rückisomerisierung stattfindet [22,26].

Die Kanalkinetiken, die aus den elektrophysiologischen Messungen stammen, gaben ebenfalls Anlass zu Spekulationen über den Photozyklus. Hier ist die Motivation ein Modell zu finden, mit dem sich der zeitliche Verlauf der Photoströme erklären lässt. Dabei werden explizit keine Aussagen über die molekulare Natur der Intermediate gemacht. Stattdessen soll ein Minimalmodell definiert werden, dass nur leitenden, offenen Zustände (O) und nicht leitenden, geschlossenen Zuständen kennt. Die Inaktivierung, also der Übergang von I_p auf I_s , zeigt, dass es mindestens ein nicht leitendes Intermediat (D) gibt, über den der Kanal zurück in den Grundzustand (C) relaxiert (Abb. 1.7 A) [1]. Hier bereitet aber die langsame Erholung des transienten Stroms Probleme. Denn dadurch war klar, dass der Photozyklus von ChR2 keinen einfachen, zyklischen Verlauf folgt, bei dem der Grundzustand irreversibel angeregt wird und über eine Reihe von Intermediaten thermisch zurück in den Grundzustand relaxiert. Wäre das der Fall, müsste man aufgrund der langsamen Erholung des transienten Stroms (Abb. 1.4 C) von einem extrem langsamen Übergang von D nach C ausgehen. Das hieße aber, dass bei einer kontinuierlichen Anregung der stationäre Strom (I_s) gegen null gehen müsste.

Zur Rettung des 3-Zustandsmodells schlugen Nicolici et al. vor, dass es neben der thermischen, langsamen Relaxation von D nach C auch eine schnelle Photokonversion gibt, die während der Anregung zu einer Beschleunigung des Photozyklus führt. Im Dunkeln bleibt diese aus und der Kanal relaxiert mit einer sehr langsamen Kinetik zurück nach C [27]. Alternativ schlugen Hegemann et al. ein Modell mit zwei leitenden (O1, O2) und zwei geschlossenen Zuständen (C1, C2) vor (Abb. 1.7 B) [28]. Eine wichtige Voraussetzung ist hierbei die Annahme,

dass die Leitfähigkeit von O2 deutlich unterhalb von O1 liegt. Des Weiteren muss der thermische Übergang von C2 nach C1 vergleichsweise langsam sein. Vor der Anregung liegt die gesamte Population in C1 vor. Daher bevölkern die Moleküle nach der Aktivierung zunächst den leitenden Zustand O1, der mit O2 im Gleichgewicht steht. Obwohl O1 sehr schnell zurück nach C1 geht, akkumuliert bei einer kontinuierlichen Anregung ein großer Teil der Moleküle in O2 und C2, da deren Entstehung und Zerfall vergleichsweise langsam sind. Wegen der geringen Leitfähigkeit von O2 nimmt der Ladungstransport im Gleichgewichtszustand ab. Damit wird der Übergang vom transienten Strom (I_p) auf den kleineren stationären Strom (I_s) erklärt. Nach dem Ende der Lichtapplikation stoppen die lichtabhängigen Übergänge $C1 \rightarrow O1$ und $C2 \rightarrow O2$. Dann relaxieren die Moleküle, die sich im zweiten Zyklus befinden sehr langsam von C2 nach C1, was durch die langsame Erholung des transienten Stroms beobachtet werden kann.

Prinzipiell ähneln sich die beiden Modellvorschläge, da sie von einem nichtleitenden Intermediat im Photozyklus ausgehen, dass durch Licht angeregt werden kann. Aus dieser Annahme resultiert auch die Photokonversion von P480_b im spektroskopischen Modell (Abb. 1.6), für die es bislang keine direkte experimentelle Bestätigung gibt. Der langsame, thermische Zerfall dieses nicht leitenden Intermediats, würde andernfalls bei einer kontinuierlichen Anregung zu dessen Akkumulation und damit zur Abnahme der Transportaktivität führen. Das wäre aber nicht mit den relativ großen Photoströmen von ChR2 im photostationären Gleichgewicht vereinbar.

Beide Modelle liefern eine qualitative Erklärung für die charakteristischen Photoströme von ChR2 im Doppelpulsexperiment (Abb. 1.4. C). Nicolic et al. passten jedoch beide Modelle an experimentelle ChR2 Photoströme an und stellten fest, dass das 4-Zustandsmodell zu einer besseren Übereinstimmung führt [29].

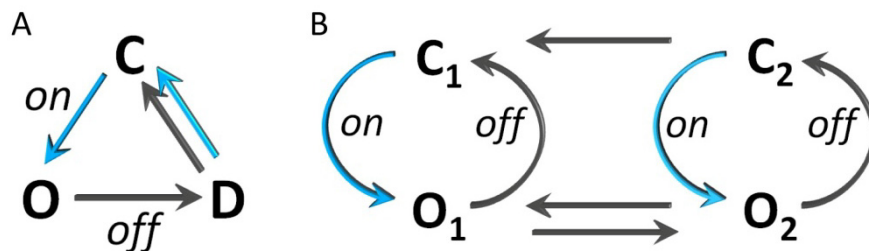


Abb. 1.7 Zustandsmodelle von ChR2 zur Modellierung der Photoströme. Beide Modelle erklären die Photoströme von ChR2 bei einer kontinuierlichen Anregung. Blaue Pfeile kennzeichnen durch Licht induzierte Konversionen und graue Pfeile langsamerer thermische Übergänge. *on* und *off* beziehen sich auf die Öffnung und das Schließen des Kanals. A Beim 3-Zustandsmodell liegt der Kanal im Dunkeln im geschlossenen Zustand C vor. Dessen Aktivierung führt zur Öffnung (O). Von hier wird der nichtleitende Zustand D bevölkert über den der Kanal nach C relaxiert. D kann im Licht auch durch eine schnelle Photokonversion umgewandelt werden (nach [27]). B Das 4-Zustandsmodell geht von zwei geschlossenen (C₁, C₂) und zwei offenen Zuständen (O₁, O₂) aus. Im Dunkeln liegt der Kanal vollständig in C₁ vor. Bei einer längeren Belichtung geht jedoch ein Großteil der Moleküle in den zweiten Zyklus über. Hier muss O₂ eine geringere Leitfähigkeit als O₁ besitzen, um die kleineren Photoströme (I_s) im Gleichgewicht zu erklären (Inaktivierung). Der Übergang $C2 \rightarrow C1$ ist extrem langsam und erklärt die langsame Erholung des transienten Stroms im Doppelpulsexperiment (nach [28]).

1.2.2 Channelrhodopsin-2 als Werkzeug in der Optogenetik

Channelrhodopsin-2 verursacht nach Lichtaktivierung eine Depolarisation der Zellmembran. Diese Eigenschaft macht den Kanal zu einem sehr nützlichen Werkzeug in der Neurophysiologie, wodurch sich in den letzten Jahren ein neuer Forschungszweig etablierte. In der Optogenetik werden die DNA-Sequenzen von lichtaktivierten Enzymen und Transportern in Zellen geschleust, die diese heterolog synthetisieren [30,31,32]. Dadurch können die Reaktionen, die mit diesen Proteinen verknüpft sind durch die Applikation von Licht nicht invasiv ausgelöst werden. Ein sehr erfolgreiches und mittlerweile gut etabliertes Beispiel ist der Einsatz von ChR2 in Neuronen [30,33,34,35]. Nervenzellen leiten elektrische Signale u.a. in Form von Aktionspotentialen weiter. Ihre Entstehung hat üblicherweise den folgenden zeitlichen Ablauf. Im Ruhezustand ist das Membranpotential von Neuronen negativ. Synaptische Inputs können die Zellmembran depolarisieren. Erreicht das Potential einen bestimmten Schwellwert werden spannungsabhängige Natriumkanäle geöffnet, was zu einer sehr schnellen Verschiebung des Membranpotentials auf positive Werte führt. Dadurch werden spannungsabhängige Kaliumkanäle geöffnet, die die Zellmembran wieder repolarisieren. Dieser Vorgang dauert nur wenige Millisekunden und kann durch elektrische Ableitungen an Neuronen mit der *Patch Clamp* Technik sichtbar gemacht werden [36]. Um die kausalen Zusammenhänge neuronaler Netzwerke zu ergründen, ist es nötig Aktionspotentiale künstlich auszulösen. Dafür gibt es eine Reihe von Möglichkeiten, z.B. der Einsatz von Neurotransmitter oder elektrische Stimulationen durch Elektroden. Der Nachteil vieler Methoden liegt aber in der zeitlichen und räumlichen Auflösung. Beispielsweise wirken chemische Botenstoffe über die Dauer einzelner Aktionspotentiale hinaus. Außerdem kann ihr Wirkradius wegen ihrer Diffusion nur schwer definiert werden. Die Verwendung von Mikroelektroden ermöglicht dagegen das zeitlich präzise Auslösen von Aktionspotentialen durch elektrische Stimuli. Dabei handelt es sich aber um eine invasive Technik, bei der physischer Kontakt mit den Zellen hergestellt werden muss. Die Methode nimmt viel Zeit in Anspruch und erlaubt keine hohen Durchsatzraten. Zudem ist die räumliche Auflösung der Stimulation auf einzelne Neuronen beschränkt.

Licht als Auslöser neuronaler Stimulation bietet theoretisch unbegrenzte Möglichkeiten und setzt zudem keinen physischen Kontakt mit den Zellen voraus. Die Dauer der Anregung könnte zwischen Nanosekunden und Stunden liegen. Außerdem könnte durch die entsprechende Optik der Anregungsradius auf subzelluläre Kompartimente beschränkt werden oder auf Millionen Neuronen ausgedehnt werden. Es gab bereits vor Channelrhodopsin Methoden bei denen Licht als Auslöser neuronaler Aktivität verwendet wurde, z.B. *caged neurotransmitter* oder die Verwendung von *photoswitched tethered ligands* an Ionenkanälen [37,38]. Diese Methoden haben ihre speziellen Nachteile z.B. durch die Verwendung von chemischen Reagenzien, die toxisch wirken können oder wegen unerwünschter Restaktivitäten im Dunkeln.

ChR2 löst einige dieser Probleme. So müssen keine toxischen Reagenzien verwendet werden und der Kanal bleibt im Dunkeln geschlossen. Dadurch sind viele Vorteile der Lichtanregung nutzbar. Die Öffnung und das Schließen des Kanals geschehen im unteren Millisekundenbereich [30]. Deshalb lassen sich in Neuronen, die ChR2 exprimieren, einzelne Aktionspotentiale durch kurze Lichtpulse auslösen. Die Einschleusung der DNA-Sequenz von ChR2 in die Zellen wurde auf sehr vielfältige Art realisiert. Am weitesten verbreitet sind Techniken bei denen Neuronen mit genetisch modifizierten, viralen Vektoren transduziert werden [34]. Des Weiteren wurden Goldpartikel, an denen Plasmide hafteten mit einer *gene gun* in die Zellen geschossen [39], sowie Neuronen von Mäusen *in utero* durch Elektroporation transfiziert [33]. Dabei kann ChR2 sowohl für *in vitro* wie auch für *in vivo* Studien verwendet werden [35,40]. Dass die DNA-Sequenz erst in die Zellen geschleust werden muss, mag einige Nachteile haben, bietet aber gleichzeitig die Möglichkeit, die Expression durch die Verwendung zellspezifischer Promotoren auf bestimmte Neuronentypen zu beschränken [34].

Insgesamt ist es mit ChR2 möglich, nicht invasiv und zeitlich präzise Aktionspotentiale in einzelnen Neuronen oder ganzen Neuronenpopulationen auszulösen. Einschränkungen ergeben sich aber durch die molekularen Eigenschaften des Kanals selbst. Die ChR2 Kinetik ist zwar schnell aber dennoch langsamer als die nativer Natrium- und Kaliumkanäle [41]. Daher war bisher das zuverlässige Auslösen von Aktionspotentialen nur bis zu einer Frequenz von 20-40 Hz möglich [42]. Des Weiteren ist der Ladungstransport durch ChR2 gegenüber den neuronalen Natrium- und Kaliumkanälen vergleichsweise klein. Die Stärke der lichtinduzierte Depolarisation, die zur Öffnung der spannungsabhängigen Natriumkanäle führt und damit das Aktionspotential auslöst, hängt aber vom Photostrom ab. Wird ein bestimmter Schwellwert nicht erreicht, bleibt das Aktionspotential aus. Dem kann man durch eine erhöhte ChR2 Expression in Neuronen entgegenwirken. Leider erfolgt der Einbau des Kanals in die Zellmembran nicht sehr effizient und es verbleibt ein hoher Anteil im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Erhöhung der Expressionslevel, beispielsweise durch die Verwendung starker Promotoren oder eine Erhöhung der DNA Kopien pro Zelle erhöht auch den Anteil im ER, was zwangsläufig zum Zelltod führt [43]. Das Anregungslicht selbst verursacht auch Probleme, da es die Zellen durch Überhitzung schädigen kann. Das Anregungsoptimum von ChR2 liegt bei ca. 470 nm. Leider wird aber insbesondere blaues Licht stärker gestreut als rotes, wodurch der effiziente Anregungsradius im neuronalen Gewebe kleiner ist.

Für die genannten Probleme könnten genetisch modifizierte Channelrhodopsine mit veränderten Eigenschaften Lösungen bieten. Wünschenswert sind Varianten mit optimierten Kinetiken, erhöhten Leitfähigkeiten, rotverschobenen Absorptionsmaxima oder solche die effizienter in die Zellmembran eingebaut werden. Ein Beispiel, das bereits in der Neurophysiologie angewendet wurde, ist die ChR2 Mutation H134R, die einen höheren Photostrom als der Wildtyp liefert und daher mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Aktionspotentiale auslöst [43].

1.3 Zielsetzung und Forschungsansatz

Diese Arbeit verfolgte mehrere Ziele. Zum einem sollte ein Modell für den Ionentransport durch ChR2 erstellt werden. Dann sollte die Rolle einzelner Aminosäuren beim Ionentransport und bei der Aktivierung aufgeklärt und damit ein Beitrag zum molekularen Mechanismus von ChR2 geliefert werden. Bei dieser Gelegenheit habe ich geprüft, wie zuverlässig verschiedene Zustandsmodelle die experimentellen Kanalkinetiken reproduzieren. Des Weiteren habe ich gezielt nach Channelrhodopsinvarianten gesucht, die als potentielle Werkzeuge in der Optogenetik verwendet werden können.

Dazu habe ich eine Reihe elektrophysiologischer Untersuchungen am Wildtyp und ChR2 Mutanten durchgeführt. Dabei habe ich deren Gesamtleitfähigkeit, Ionenselektivität, Kanalkinetiken und Anregungsmaxima mit der *Two Electrode Voltage Clamp* (TEVC) Technik an Oocyten von *Xenopus laevis* untersucht [44]. Während der Dauer der Dissertation stand ich in engen Kontakt zu Mitarbeitern unserer und kooperierender Arbeitsgruppen. So komplementierten meine Daten zum Beispiel Resultate aus spektroskopischen Untersuchungen. Des Weiteren gab es enge Kontakte zu theoretisch arbeitenden Wissenschaftlern, die sehr hilfreich bei der Modellentwicklung und beim molekularen Verständnis des Kanalmechanismus waren. Die Einführung von optimierten Channelrhodopsinvarianten in die Optogenetik erfolgte schließlich in enger Zusammenarbeit mit neurophysiologischen Arbeitsgruppen.

Die Auswahl der Aminosäuren für die Mutationsstudien erfolgte meistens im Hinblick auf Bakteriorhodopsin. BR ist eine lichtgetriebene Pumpe und ChR2 ein lichtaktivierter Kationenkanal. Es ist klar, dass die funktionellen Unterschiede und auch die Gemeinsamkeiten bereits in den Proteinsequenzen festgelegt sein müssen. So findet sich eine hohe Übereinstimmung bei Resten der Retinalbindungstasche sowie bei Resten, die in BR die Protonenleitungskette bilden und für die Aktivierung entscheidend sind. Hier gibt es aber bereits bemerkenswerte Ausnahmen. So führen die Aminosäuren der ChR2 Bindungstasche insgesamt zu einer höheren Polarisierung des Chromophors. Zum Beispiel befinden sich bei BR in der Nähe der Schiffbase A215 und am β -Iononring S141 und T142. Bei ChR2 sind an den analogen Positionen S256, G181 und L182 lokalisiert. Dies könnte zu einer Erhöhung der Anregungsenergie führen und damit einen Beitrag zu dem gegenüber BR deutlich blauverschobenen ChR2-Anregungsmaximum liefern [45]. Die Protonenleitungskette ist auch nur in Teilen konserviert. Statt D96, das in BR die Schiffbase reprotoniert, befindet sich an dieser Position in ChR2 ein Histidin (H134). Von der *proton release group* ist nur E235 (BR-E194) erhalten. Des Weiteren ist die Homologie zwischen beiden Proteinen besonders in den ersten zwei Helices gering. Hier befinden sich in ChR2 und allen anderen bekannten Channelrhodopsinen mehrere Glutamate, die aber nicht bei anderen mikrobiellen Rhodopsinen vorkommen. Wegen der Abstände, die die geladenen Reste zueinander haben, müssten deren Seitengruppen in einer α -Helix übereinander liegen. Allerdings gibt es dafür keine experimentellen Belege. Nach dem

Homologiemodell von Suzuki et al. sind die geladenen Seitengruppen zur Plasmamembran orientiert [23]. Dies ist aus thermodynamischer Sicht extrem unwahrscheinlich und in der Realität sind sie wahrscheinlich zum Proteininneren orientiert. Nichtsdestotrotz sind diese Reste mit hoher Sicherheit an der Porenbildung und am Ionentransport beteiligt. Ich bin dem Ansatz von Suzuki et al. gefolgt und erstellte bereit während meiner Diplomarbeit ein Homologiemodell von ChR2 auf der Basis von Röntgenstrukturdaten von BR (Abb. 1.8). Es soll in erster Linie eine grobe Lokalisierung der mutierten Aminosäuren ermöglichen und wird deshalb oft als Referenz bei der Diskussion meiner Resultate herangezogen.

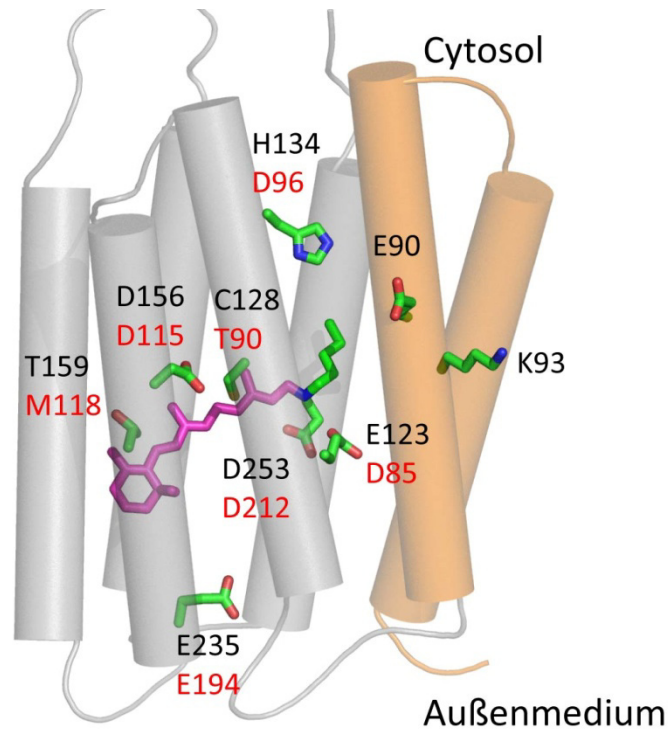


Abb. 1.8 Homologiemodell von ChR2 auf der Basis von Röntgenstrukturdaten von BR. (pdb: 1C3W) Für die Modellierung verwendete ich das in Abb. 1.5 gezeigte Alignment. Alle hier genannten Reste wurden in der vorliegenden Studie gegen eine oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht. Die schwarzen Label kennzeichnen die ChR2 Positionen, darunter sind die analogen Aminosäuren von BR angegeben (rot). In den ersten zwei Helices (orange) ist die Homologie besonders gering, daher konnten deren Reste nicht eindeutig zugeordnet werden. Die geladenen Reste der Helix 2 (E90, K93) sind wahrscheinlich zum Proteininneren orientiert.

2. Material und Methoden

2.1 *Xenopus laevis* Oocyten

Oocyten von *Xenopus laevis* haben einen Durchmesser von über 1 mm, was deren Handhabung erheblich erleichtert. Einen Teil bezog ich von der Firma Ecocyte Bioscience. Die Lieferung der Zellen erfolgte zwei Tage nach ihrer Entnahme aus *Xenopus* und ohne ihre Follikelmembran. Während des Transports lagerten sie in penicillin- und streptomycinhaltiger Barth's Lösung bei ca. 4°C.

Die restlichen Zellen stammten von institutseigenen Fröschen und wurden von Maila Reh entnommen. Nach ihrer Entnahme sind die Froscheier durch eine dichte extrazelluläre Matrix miteinander verbunden und von der Follikelmembran umgeben. Die Entfernung dieses Materials erfolgte enzymatisch, indem die Zellen für 2h in 20 ml Oocyten Ringer Lösung (ORI), ohne Calcium, mit 2 ml Collagenase (2 mg/ml) und 2 ml Trypsin (1 mg/ml) in einem Schüttelinkubator bei 18°C und 70 rpm aufbewahrt wurden.

Anschließend kamen die Zellen in eine frische, autoklavierte 1x ORI Lösung. Mit Ausnahme der Froschoperation erfolgte die weitere Behandlung der Zellen unter nicht sterilen Bedingungen. Die weitere Lagerung erfolgte ebenfalls bei 18°C.

2.2 *Molekularbiologisches Material*

2.2.1 Ausgangsvektor und Primer für die Mutagenese

Der Ausgangsvektor für die Mutagenese lag bereits vor und wurde von Dr. Satoshi Tsunoda zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um *pGEM-HE* (Promega), in den die ChR2 cDNA-Sequenz (1041 bp) zwischen die *Bam*HI und *Hind*III Restriktionsstellen kloniert wurde (Abb. 2.1). Statt die vollständige ChR2 Sequenz mit 737 Aminosäuren zu verwenden, arbeitete ich mit einer kürzeren Variante (1-347 AS), bei der ein Großteil der für die Ionenleitung unerheblichen cytosolischen Domäne entfernt wurde. Der Vektor enthält außerdem eine kodierte Ampicillinresistenz zur Selektion erfolgreich transformierter *E. coli* Zellen, eine *Nhe*I Restriktionsstelle für die Linearisierung des Plasmids, sowie einen T7-RNA-Polymerase-Promotor unmittelbar vor der ChR2 kodierenden Sequenz.

Das Design der Vorwärts- und Rückwärtsprimer entsprach weitgehend den Vorgaben des QuickChange® Kits für Punktmutationen. Die Primer wurden von den Firmen Operon Biotechnologies und Sigma-Genosys hergestellt und geliefert. Die Sequenzen der Vorwärtsprimer sind im Anhang angegeben (Tab. A.1). Nach der Lieferung verdünnte ich sie mit autoklavierten dd H₂O auf eine Konzentration von 1 µg/µl und bewahrte sie anschließend bei -20°C auf.

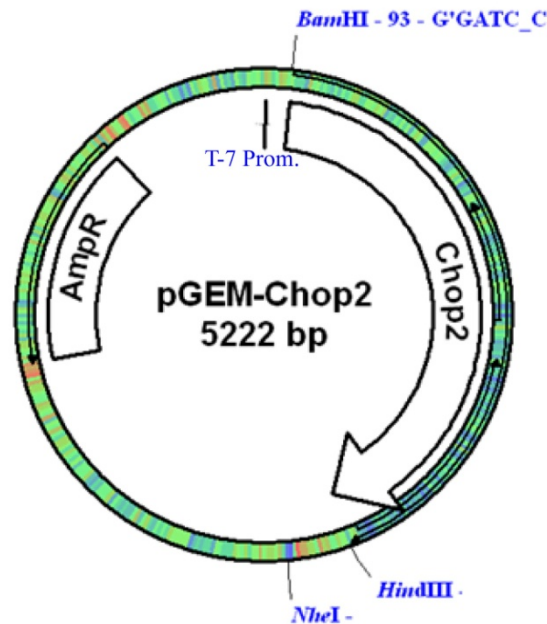


Abb. 2.1 Vektorkarte von pGEM-ChR2. Die ChR2 Sequenz (Chop2) wurde zwischen die *Bam*HI und *Hind*III Restriktionsstellen kloniert. Unmittelbar davor befindet sich der T7 Promotor. Der Vektor enthält eine Ampicillinresistenz (*Amp*R) für die Selektion.

2.2.2 Medien zur Inkubation von Oocyten und *E. coli*

Für die Inkubation transformierter *E. coli* Zellen verwendete ich LB Agarplatten bzw. flüssiges LB Medium. Vor Gebrauch wurden die Medien autoklaviert und mit Ampicillin (100 µg/ml) (Sigma) versetzt. So konnten die Platten für vier und das flüssige LB Medium für maximal zwei Wochen bei 4°C gelagert werden. Die Rezeptur lautet:

1 l dd H₂O
10 g Trypton (BD)
5 g Hefe Extrakt (BD)
10 g NaCl (Merck)
15 g Agar (BD) (für Platten)

Zur Lagerung der Oocyten verwendete ich Oocyten Ringer Lösung (ORI):

1 l dd H₂O (gefiltert)
96 mM NaCl (Merck)
5 mM KCl (Merck)
1 mM MgCl₂ (Merck)
2 mM CaCl₂ (Merck)
5 mM MOPS (Sigma)

Die Lösungen wurden mit NaOH und HCl auf pH 7,5 justiert sowie mit Penicillin (50 U/l) und Streptomycin (0,05 mg/l) (Sigma) versetzt. Die ORI-Lösungen wurden bei 4°C gelagert und für maximal 10 Tage verwendet.

2.2.3 DNA und RNA Gelelektrophorese

Die Kontrolle der Produkte von PCR, Plasmidaufreinigungen und DNA→RNA Transkriptionen erfolgte in 1% Agarosegelen, die mit 1x TAE Puffer angesetzt wurden. Die RNA Gele enthielten zur Färbung Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), während die DNA Banden mit SYBR Green® I gefärbt wurden (1 µl im DNA Ansatz).

Tab. 2.1 Material für Gelelektrophorese

Name	Firma	Verwendungszweck
TAE Puffer	Merck	Ca ⁺⁺ Puffer
Agarose GTQ	Roth	Gelherstellung
SYBR Green I	Molecular Probes	DNA Färbung
Orange Green Loading Dye	Fermentas	DNA Lade Puffer
O' Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas	DNA Marker
Ethidiumbromid	Sigma	RNA Färbung
RNA Ladder Sample Buffer	NEB	RNA Lade Puffer
ssRNA Ladder	NEB	RNA Marker

2.2.4 Kits

Für die Mutagenese, die Aufreinigung der amplifizierten Plasmide nach *E. coli* Transformation und Linearisierung, sowie für die Transkription von cDNA in mRNA benutzte ich Kits, die bereits alle dafür notwendigen Materialien enthielten.

Tab. 2.2 Liste verwendeter Kits

Name	Firma	Verwendungszweck
QuickChange® Site Directed Mutagenesis	Agilent Technologies	Mutagenese
NucleoSpin Plasmid®	Macherey-Nagel	Isolierung von amplifizierter Plasmid-DANN aus <i>E. coli</i>
NucleoSpin Extract II®	Macherey-Nagel	Aufreinigung von linearisierter DNA
mMESSAGE mMACHINE®	Applied Biosystems	DNA zu RNA Transkription

2.3 Technische Hilfsmittel

2.3.1 Geräte für die molekularbiologische Arbeit

Tab. 2.3 Liste von Geräten die für die Präparation der mRNA notwendig sind.

Gerät	Firma und Typ	Verwendungszweck
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5415R	DNA und RNA Aufreinigung
-80°C Tiefkühler	Tenak	RNA Lagerung
Spannungsquelle- Gelelektrophorese	Biometra Power Pack P25 T	DNA/RNA Gelelektrophorese
Transiluminator	NTAS Gel Jet Imager 2004	Visualisierung von DNA und RNA Banden im Agarosegel
Photometer	Amersham Bioscience Ultrospec 1100 Pro	Bestimmung von DNA und RNA Konzentration
Sterilbank	Nunc Microflow Laminar Workstation	Beimpfung von flüssig LB und LB Agarplatten
Thermocycler	Biometra Personal Cycler	PCR
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort	Hitzeschock für <i>E.coli</i> - Transformation
Inkubator für <i>E. coli</i>	New Brunswick Scientific Innova 4230	Plasmid Amplifizierung
Speed-vac	KNF Lab	Trocknen von RNA nach Aufreinigung
Puller für Glaskapillaren	Sutter Instruments Micropipette Puller P-97	Herstellung von Mikroinjektionsnadeln
Stereomikroskop	Zeiss GSZ	Optische Vergrößerung der Oocyten bei RNA Injektion
Mikroinjektor	World Precision Instruments Nanoliter 2000	Injektion von RNA in Oocyten
Glasskapillaren	World Precision Instruments Glass Replacement 3.5 Nanoltr OD = 1.14 mm ID = 0.5 mm	Injektion von RNA in Oocyten
Inkubator für Oocyten	Sanjo MIR-153	ChR2 Expression

2.3.2 Geräte für die elektrophysiologischen Messungen (TEVC)

Tab. 2.4 Liste der Geräte für die elektrophysiologischen Messungen an Oocyten.

Gerät	Firma und Spezifikation	Verwendungszweck
Verstärker	Molecular Devices GeneClamp 500	Verarbeitung und Kontrolle von elektrischen Signalen
Digital-Analog-Wandler	Molecular Devices Digidata 1322 A	Umwandlung digitaler in analoge Signale und umgekehrt
Headstages/ Vorverstärker	Molecular Devices Potentialelektrode: HS2A 1LU Stromelektrode: HS2A 10MGU Badklemme: VG-2A x100	Aufnahme, Weiterleitung und Verstärkung elektrischer Signale
Mikroelektroden	Clark Elektromedical Instruments Borosilikatglasskapillaren GC 150 TF-7.5 OD = 1.5 mm ID = 1.17 mm <u>Silberdrähte</u> : Science Products Ag – 10T /Ag – 25T	Ableitung elektrischer Signale aus Oocyten
PC	PII Microsoft Windows 98	Steuerung der Komponenten
Stereomikroskop	Wild Heerbrugg Wild M32 / Type S	Optische Vergrößerung der Oocyten in Messkammer
Mikro-manipulatoren	Micro Controle	Bewegung der Mikroelektroden
Lichtquelle für kontinuierliche Anregung	Leistungselektronik Jena <u>Gehäuse</u> : Ih-x 75i/340-26A <u>Netzgerät</u> : ebx 75 <u>Leuchtmittel</u> : Osram XBO 75 W/2	Anhaltende ChR2 Aktivierung
Verschluss/ <i>Shutter</i>	Vincent Associates Uniblitz LS6 ZM2	Zeitliche Kontrolle über die Lichtapplikation
Lichtleiter	Laser components	Lichtleitung
Farbfilter	<u>Breitband</u> : Balzers K50, K45, K40 <u>Schmalband</u> : Balzers	Auswahl der Anregungswellenlänge bei Verwendung der Xenonlampe
Intensitätsfilter	Schott	Variation der Lichtintensität
Photodiode	United Detector Technology	Messung der Lichtintensität
Lichtquelle für Laserblitzanregung	Nd:YAG laser von Quantel mit Rainbow OPO von Opotek	Synchrone ChR2 Aktivierung im Nanosekundenbereich

2.3.3 Software

Tab. 2.5 Liste der verwendeten Software zur Datengewinnung und –verarbeitung, sowie zur Darstellung der Ergebnisse.

Name	Firma	Verwendungszweck
Pymol 0.99	DeLano Scientific LLC	Darstellung von 3D-Proteinstrukturen
GENtle	Autor: Magnus Manske	DNA-Sequenzalignment
Clampex 10	Molecular Devices	Datenakquisition
Clampfit 10	Molecular Devices	Datenauswertung
OriginPro 8G	Origin Lab Cooperation	Datenverarbeitung und -darstellung
MS Office Excel 2007	Microsoft	Datenverwaltung
Mathematica 5.2	Wolfram Research	Kinetische Modellierung

2.4 mRNA Präparation

2.4.1 Mutagenese der Chr2-WT DNA-Sequenz

Um Einzelmutationen in die DNA-Sequenz des Wildtyps einzuführen, folgte ich weitgehend dem Protokoll des QuickChange® *site directed mutagenesis* Kits (Agilent Technologies).

1. Ansetzen des Reaktionsansatzes für die PCR in autoklavierten, nukleasefreien 500 µl Eppendorfgefäßen (*PCR-grade*):
100 ng Ausgangsvektor: pGEM-HE-Chr2(1-347)
125 ng Vorwärts *Primer*
125 ng Rückwärts *Primer*
5 µl Pfu Reaktionspuffer (Agilent Technologies)
1 µl dNTP Mix (Agilent oder Fermentas, Endkonzentration: 100 - 250 mM pro Nukleotid)
1 µl *PfuTurbo DNA* Polymerase (2,5 U/µl)
+ H₂O auf 50 µl Endvolumen
2. Durchführung der PCR mit 30 Elongationszyklen (je 6 min) bei einer Temperatur von 70°C, Hybridisierung bei 55°C für 45 s.
3. Verdau der methylierten *template* Plasmide durch Zugabe von 1 µl DpnI (10 U/µl) zum PCR Ansatz und anschließende Inkubation bei 37°C (1 h)
4. Kontrolle der PCR durch Gelelektrophorese:
Gelzusammensetzung:
0,7 g Agarose
70 ml 1x TAE
Kontrolle:

3 µl DNA Marker (Fermentas)

DNA Probe:

5 µl Lösung des PCR Produkts

4 µl dd H₂O

2 µl Orange Loading Dye

1 µ SYBR Green I (20x, Molecular Probes)

Die Gele liefen für 25 min in 1x TAE Puffer bei 80 V.

2.4.2 *E. coli* Transformation durch Hitzeschock

Nach der PCR mussten die mutierten Plasmide amplifiziert werden. Dies geschah in *E. coli* Zellen (*XLI-Blue*), in die ich die DNA durch einen Hitzeschock eingeschleust habe.

1. Auftauen der *XLI-Blue* Zellen (-80°C) auf Eis und Umfüllen in autoklavierte 1,5 ml Eppendorfgefäße zu je 100 µl. Dann erfolgt die Zugabe von 100 µl autoklavierter 0,1 M CaCl₂ Lösung.
2. Zugabe von 5-8 µl des PCR Produkts und anschließende Inkubation der Zellen auf Eis (15 min).
3. Hitzeschock im Thermocycler für 45 s bei 42°C mit anschließender Inkubation auf Eis (2 min).
4. Zugabe von 250 µl flüssigem LB-Medium. Danach erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Thermomixer (30 min, 300 rpm).
5. Unter der Sterilbank erfolgte das Ausplattieren der Zelllösung auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (100 µg/ml), die über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.
6. Am nächsten Tag erfolgte unter der Sterilbank das Beimpfen von flüssigem LB-Medium mit Kolonien von den Agarplatten. Dazu füllte ich jeweils 3,5 ml vorgewärmtes LB-Medium in 10 ml Glasröhrchen und gab Ampicillin (100 µg/ml) dazu. *E. coli* Kolonien wurden mit sterilen Pipettenspitzen von den Agarplatten gepickt und in die Glasröhrchen gegeben. Diese lagerte ich anschließend bei 37°C im Schüttelinkubator (16 h – 20 h, 180 rpm).

2.4.3 Isolierung der Plasmide aus *E.coli*

Bei der Isolierung der DNA aus *E. coli* Kulturen verwendete ich das NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel) und folgte dabei den Vorgaben des Protokolls.

Die cDNA wurde vom Sequenzierungsservice ABI BigDye-Terminator-Chemie (Berlin) sequenziert. Dazu stellte ich jeweils 2 µg Plasmid, gelöst in 20 µl dd H₂O zur Verfügung. Anschließend verglich ich die cDNA-Sequenzen mit der FASTA Sequenz von Chr2-WT (GenBank: #AF461397), um zu kontrollieren ob die Mutagenese erfolgreich war.

2.4.4 Transkription der mRNA

1. Zunächst musste der Vektor für die *in-vitro* Transkription linearisiert werden. Dazu bereitete ich folgenden Reaktionsansatz in autoklavierten, nukleasefreien 1,5 ml Eppendorfgefäßen vor:

3 µg Plasmid
5 µl Puffer 2 (NEB)
5 µl BSA (1 mg/ml, NEB)
3 µl NheI (10000 U/ml, NEB)
+ H₂O auf 50 µl Endvolumen

Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert (3 h - 5 h) und anschließend durch Gelelektrophorese kontrolliert. Als Kontrolle wurden nicht linearisierte Plasmide aufgetragen.

2. Die linearisierte DNA wurde mit dem Nucleo Spin Extract II Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt, wobei ich mich an die Vorgaben der Anleitung hielt.

Im Folgenden wurde streng auf RNase freies Arbeiten geachtet. Dazu gehörten die Verwendung von nukleasefreien Gefäßen, Pipettenspitzen und H₂O, das Tragen von Nitrilhandschuhen sowie das Absprühen von Flächen mit RNase Away® (Molecular Probes).

3. Die *in vitro* mRNA Transkription erfolgte nach dem Protokoll des mMessage mMachine® Kits (Applied Biosystems).

2.4.5 ChR2 Expression in Xenopusoocyten

Die Injektion der mRNA in die Oocyten erfolgte 2 - 4 Tage nach ihrer Entnahme aus *Xenopus laevis*. Dabei wurde auf eine RNase freie Arbeitsumgebung geachtet (Nitrilhandschuhe, RNase Away®, nukleasefreie Gefäße).

1. Herstellung der Injektionsnadel (ca. 5µl Volumen): Dazu wurden die Enden der Glasskapillaren (Tab. 2.4) durch Wärmebehandlung und Zug im *Micropipette Puller* in die Länge gezogen, so dass sie spitz zuliefen. Die entstandenen Spitzen wurden mit einer Pinzette abgebrochen, wodurch Öffnungen von 10-30 µm Durchmesser entstanden.
2. Ich füllte die Injektionsnadeln mit Hilfe einer Spritze, mit rot gefärbtem Mineralöl und montierte sie auf den Mikroinjektor. Dann wurde ein Teil des Öls aus der Spitze gepresst und anschließend 1-2 µl RNA Lösung von einem Stück Parafilm aufgezogen.
3. Die Oocyten wurden in einer genoppten, mit ORI gefüllten Kammer unter ein Stereomikroskop gelegt. Anschließend injizierte ich jeweils 25 nl - 50 nl der mRNA-Lösung. Bei einer Konzentration von 1µg/µl entspricht dies einer Gesamtmenge von 25 ng - 50 ng mRNA pro Oocyte.

4. Die präparierten Zellen überführte ich einzeln in, mit ORI-Lösung gefüllte Kammern einer sterilen 24x *multi well* Platte. Danach lagerten sie bei 18°C in einem abgedunkelten Inkubator (max. 12 d). Die ORI-Lösung wurde alle zwei Tage gewechselt und enthielt Penicillin und Streptomycin (Kap. 2.2.7).

2.5 TEVC Messung

An den Oocyten konnten, für einen Zeitraum von 3-12 Tagen nach der mRNA-Injektion electrophysiologische Experimente durchgeführt werden. Dabei gab es zwei Varianten zur ChR2 Aktivierung. Für die Applikation von kontinuierlichen Lichtpulsen (>100 ms) verwendete ich eine Xenon Bogenlampe. Die zeitliche Kontrolle erfolgte dabei über eine computergesteuerte, mechanische Blende, die eine Öffnungsdauer von 700 μ s hat. Das Spektrum der Bogenlampe beinhaltet den gesamten sichtbaren Bereich. Zur Kontrolle der Anregungswellenlänge verwendete ich FarbfILTER und für die Variation der Lichtintensität Graufilter (Tab. 2.4). Die höchste Intensität (7 mW/mm^2) wurde mit einem 500 nm (± 25 nm) Breitbandfilter erreicht.

Für die Applikation von Lichtblitzen im Nanosekundenbereich (10 ns) verwendete ich einen gepulsten Nd:YAG Laser in Verbindung mit einem optisch parametrischen Oszillator (OPO), der eine präzise Einstellung der Wellenlänge im sichtbaren Bereich ermöglichte. In beiden Fällen wurde das Licht mittels Lichtleitern auf die Oocytenmembran projiziert. Die Oocyten befanden sich in einer Kammer, umgeben von der jeweiligen Messlösung. Zur Charakterisierung von ChR2 wurden verschiedene Lösungen verwendet, die sich hinsichtlich des pH-Wertes und der Ionenzusammensetzung unterschieden. Einzelne Oocyten wurden während einer oft mehrstündigen Messreihe, durch Austausch des Messpuffers unter bis zu acht verschiedenen äußeren Bedingungen getestet.

2.5.1 Herstellung der Mikroelektroden

Die Mikroelektroden entsprachen dem im Anhang in Abb. A.1 gezeigten Aufbau. Dazu wurden zunächst Borosilikatglasskapillaren unter Wärmeeinwirkung im *Micropipette Puller* gezogen, damit an ihren Spitzen eine Öffnung von 0,01 – 0,1 μ m entstehen konnte.

Für die Bildung einer Ag/AgCl Schicht an den Silberdrähten wurden sie in einer 3 M KCl Lösung chloriert.

2.5.2 Experimenteller Aufbau

Der Aufbau ist schematisch in Abb. 2.2 gezeigt. Die Empfindlichkeit der Messapparatur und die geringe Größe der ChR2 Ströme, die im Nanoamperebereich lagen, machten besondere Schutzmaßnahmen gegen äußere, elektrische Störsignale erforderlich. Deshalb ist der Aufbau aus Messkammer und

Mikroelektroden von einem geerdeten Faraday-Käfig umgeben. Bad- und *Sense*-Elektrode bestehen ebenfalls aus Ag/AgCl Drähten, und standen über sogenannte Agarbrücken mit der Messlösung in Kontakt. Dazu wurde auf Basis einer 3 M KCl Lösung ein 1% Agarosegel hergestellt und im flüssigen Zustand in Pipettenspitzen gefüllt. Nach der Abkühlung des Gels, wurden die Bad- und *Sense*-Elektrode jeweils in eine Agarbrücke getaucht und diese in der Messkammer platziert. Ihr Boden besteht aus einem Mikroskopierdeckblättchen auf dem sich die Oocyte befindet. Darunter befand sich das Ende des Lichtleiters, der das Licht von der Lichtquelle direkt zur Oocytenmembran führte. Über spezielle Halterungen waren die Mikroelektroden mit den sogenannten *headstages* (Vorverstärker) verbunden, die wiederum auf Mikromanipulatoren ruhten. Die manuelle Steuerung der Mikroelektroden konnte durch ein Stereomikroskop verfolgt werden. Der Verstärker kontrollierte das Membranpotential, verstärkte ankommende Signale und sendete Spannungs- und Strompulse. Ein DA/AD Wandler konvertierte analoge in digitale Signale für die computergestützte Datenverarbeitung. Außerdem wandelte er die vom PC kommenden Steuerungsimpulse für die Blende und den Verstärker in analoge Signale um. Die Datenausgabe und die Steuerung der Messungen erfolgten am PC.

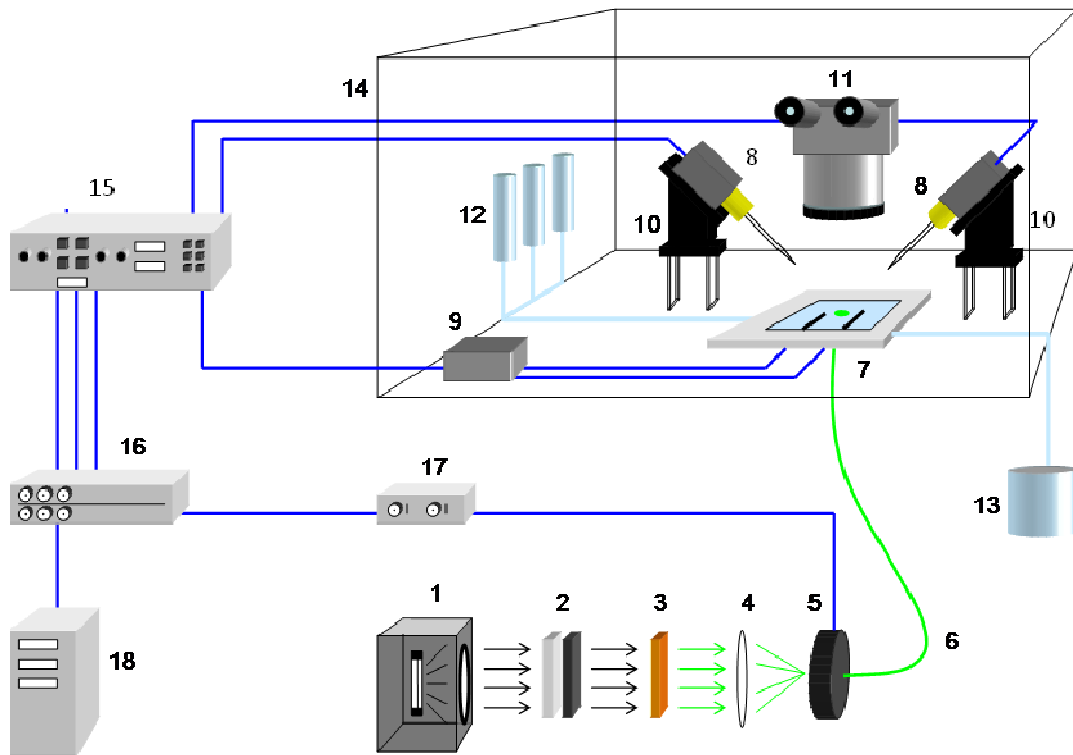


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Dunkelblaue Verbindungen kennzeichnen die Weitergabe elektrischer Signale und hellblaue den Transport von Lösungen. 1 Lichtquelle (Xenon Bogenlampe oder Laser) 2 Hitzefilter (entfällt bei Laser) und Intensitätsfilter 3 Farbfilter (entfällt bei Laser) 4 Linse 5 Blende (entfällt bei Laser) 6 Lichtleiter 7 Messkammer mit Bad- und *Sense* Elektrode (schwarz) sowie Ein- und Auslässe zum Lösungswechsel 8 Anordnung aus *Headstage* (grau), Elektrodenhalter (gelb) und Mikroelektrode (farblos) 9 *Headstage* für Badklemme 10 Mikromanipulatoren 11 Stereomikroskop 12 Lösungsreservoirs 13 Abfluss für verbrauchte Lösungen 14 Faraday-Käfig 15 Verstärker 16 DA/AD Wandler 17 Steuerungsmodul für Verschluss 18 PC

2.5.3 Messvorbereitung

Zunächst wurden die Oocyten in die mit Lösung gefüllte Messkammer gelegt und einer optischen Kontrolle unterzogen. Dabei achtete ich auf den allgemeinen Zustand der Zelle und insbesondere darauf, ob Cytoplasma austrat. In diesem Fall wurde die Zelle ausgetauscht. Die Mikroelektroden wurden in die Messlösung getaucht. Der Verstärker befand sich zu diesem Zeitpunkt im sogenannten *setup mode*. Der Wert für den Elektrodenwiderstand sollte zwischen 0,3 - 2 M Ω liegen. Die Spannung zwischen den Messelektroden und der Badelektrode wurde auf null gesetzt. Als nächstes führte ich die Mikroelektroden auf die Oocytenmembran, so dass diese leicht eingedrückt wurde. Durch einen präzisen Schlag auf die *headstages* durchdrangen sie die Membran und konnten anschließend noch etwas weiter in die Zelle geführt werden. Anschließend wurde der Verstärker in den *Voltage Clamp* Modus geschaltet, woraufhin er die aktuelle Membranspannung und den Membranstrom anzeigt. Im Idealfall, d.h. bei unbeschädigter Zellmembran ist der Widerstand hoch und der Stromfluss auf einem konstanten, niedrigen Level. Zu diesem Zeitpunkt war die Membranspannung geklemmt und einstellbar. Zunächst wurde ein Wert eingestellt, bei dem während der Phasen zwischen den Messungen kein Membranstrom floss. Diese Ruhespannung (E_{rest}) liegt im Idealfall zwischen -10 mV und -40 mV.

2.5.4 Durchführung der TEVC-Experimente

Die Datenakquisition sowie die zeitliche Kontrolle über die Lichtapplikation und das Klemmpotential wurden mit dem Programm Clampex realisiert. Es ermöglicht die Programmierung von Messprotokollen, die den jeweiligen experimentellen Anforderungen gerecht werden.

Alle Messungen haben grundsätzlich den gleichen Ablauf (Abb. 2.3):

1. Anlegen eines Klemmpotentials
2. Lichtapplikation führt zur ChR2 Aktivierung
3. Nach Ende der Lichtapplikation erfolgte eine Abklingphase, in der die Photoströme auf null zurückgehen.

Durch das Anlegen der Klemmspannung (E) öffnen sich in der Oocytenmembran native, spannungsabhängige Ionenkanäle, die bei intakter Zellmembran einen stabilen Membranstrom verursachen (I_{Ocy}). Die nachfolgende Aktivierung von ChR2 induziert einen zusätzlichen, messbaren Ladungstransport. Somit ist der Photostrom von ChR2 (I) einfach als Differenz zu I_{Ocy} identifizier- und auslesbar. Üblicherweise gebe ich für den Photostrom von ChR2 diese Differenz an und nicht den absoluten Membranstrom aus $I + I_{\text{Ocy}}$. Das heißt, I_{Ocy} ist der Referenzwert für den Photostrom (I) und wurde daher bei der Auswertung auf null gesetzt.

Die Aufnahmefrequenzen lagen zwischen 1 kHz und 250 kHz.

Strom/Spannungsmessungen

Bei den Strom/Spannungsmessungen (*IV*) wurden die Oocyten mit kontinuierlichen Lichtpulsen angeregt und die Photoströme gemessen. Dabei variierte ich die äußeren Bedingungen. Zunächst wurden die Messungen bei Spannungen zwischen

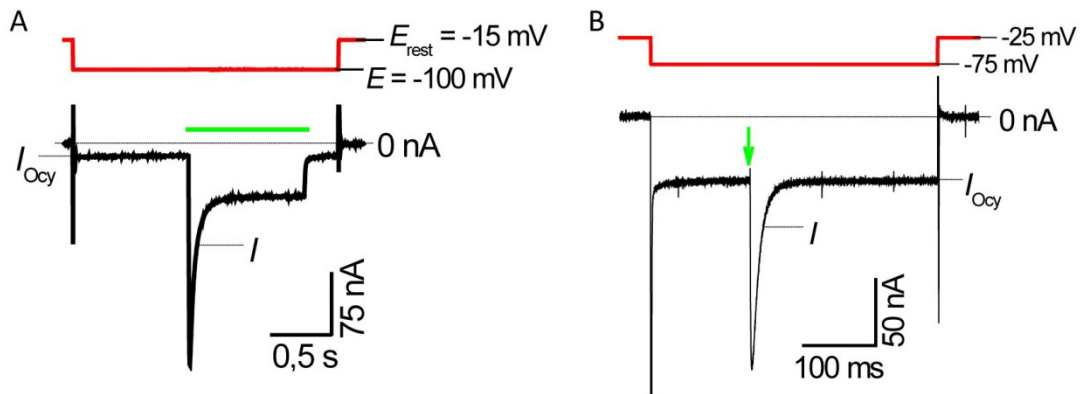


Abb. 2.3 Typische Stromspuren bei Two Electrode Voltage Clamp Messungen an ChR2 exprimierenden Oocyten. Oben: zeitlicher Verlauf der Membranspannung. Unten: zeitlicher Verlauf des Membranstroms. **A** Messung bei pH_e 7,5 mit einem kontinuierlichen Lichtpuls (grüner Balken). Unmittelbar vor Anlegen des Klemmpotentials (E) liegt das Ruhepotential (E_{rest}) an, bei dem kein Membranstrom messbar ist. Das Anlegen der Klemmspannung (E) führt zu einem Membranstrom (I_{Ocy}) durch die nativen Oocytenkanäle. Die Applikation von Licht führt zur Aktivierung von ChR2 und zu einem zusätzlichen Ladungstransport (I). I_{Ocy} dient als Referenz für die Amplitude des Photostroms. **B** Bei dieser Messung wurde ChR2 durch einen 10 ns Laserblitz aktiviert (grüner Pfeil).

-125 mV und +50 mV mit Potentialsprüngen von 25 mV durchgeführt. Die Amplituden wurden in einem XY-Diagramm gegen die Klemmspannungen aufgetragen und ergaben die IV -Kurven (Abb. 2.4). Negative Amplituden kennzeichnen den Nettoeinstrom und positive Werte den Nettoausstrom von positiven Ladungsträgern. Dabei unterschied ich zwischen dem Anfangsstrom I_0 , dem stationären Strom I_s und I_p . Bei der Aktivierung stieg der Betrag des Photostroms auf ein hohes transientes Level (I_p) und fiel auf ein niedrigeres stationäres Niveau (I_s). Der Maximalwert wurde nach ca. 12 ms erreicht. Hier war ein Teil der Kanäle schon wieder inaktiv, da sie den Photozyklus bereits einmal durchlaufen hatten. I_0 ist die lineare Approximation der Kinetik die in den Gleichgewichtszustand führte auf den Beginn der Lichtapplikation ($t = 0$, Abb. 2.4). I_0 soll gewissermaßen den Strom wiedergeben, der auftritt, wenn alle Kanäle gleichzeitig aktiv sind. Die Amplituden von I_0 und I_p hängen auch von der sogenannten *Recovery* Kinetik ab, die im nächsten Abschnitt näher erläutert wird. Da die genaue Bestimmung von I_0 eine vollständige Erholung des transienten Stroms voraussetzte, musste zwischen den einzelnen Spannungswechseln eine Pause eingelegt werden. Beim Wildtyp musste ich bei pH_e 7,5 beispielsweise 100 s warten bevor eine neue Stromspur aufgenommen werden konnte. Ein kompletter Durchlauf von -125 mV bis +50 mV dauerte somit fast 12 Minuten.

Die Strom/Spannungsmessungen ergaben für jede Lösung jeweils eine IV -Kurve für I_0 und I_s . Wenn der Messpuffer ausgetauscht wurde und das Außenmedium damit eine andere ionale Zusammensetzung enthielt, veränderten sich die Stromamplituden. Deren absoluten Werte, die von der Anzahl der aktiven Kanäle abhängen, waren expressionsbedingt von Oocyte zu Oocyte sehr unterschiedlich. Allerdings waren die Verhältnisse der Stromamplituden zueinander immer gleich. Wenn beispielsweise die Erhöhung der Konzentration eines Ladungsträgers zur Verdopplung des Einstroms führte, konnte ich das bei jeder Zelle unabhängig vom

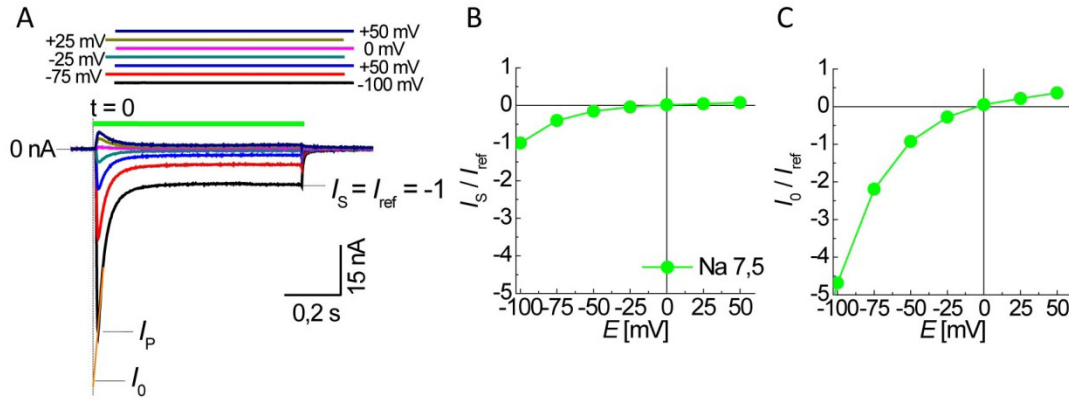


Abb. 2.4 Vorgehensweise beim Auslesen und Normieren der Stromamplituden einer Strom/Spannungsmessung unter physiologischen Bedingungen. **A** Oben: Angelegte Klemmspannungen (E). Unten: Die daraus resultierenden Photoströme nach Lichtapplikation (grüner Balken). Zwischen den Spannungssprüngen lag wegen der Recovery Kinetik jeweils eine Pause von 100 s, um die vollständige Erholung von I_0 sicher zu stellen. I_{Ocy} wurde hier bereits auf 0 nA gesetzt. I_0 ist die lineare Approximation (orange) der Inaktivierungskinetik auf den Beginn der Lichtapplikation ($t = 0$). Negative Amplituden kennzeichnen den Einstrom und positive Amplituden den Ausstrom von positiven Ladungsträgern. **B** Normierte Stromamplituden von I_0 und **(C)** I_S bei pH_e 7,5 mit 100 mM NaCl im Außenmedium. Der stationäre Strom (I_S) bei -100 mV dient als Referenzwert (I_{ref}) für die Normierung von I_0 und I_S . Dabei wurde darauf geachtet, dass die Richtung der Stromamplituden unverändert blieb.

Expressionslevel beobachten. Daher habe ich die Stromamplituden immer auf einen Referenzwert normiert. Dies ist die Stromamplitude des stationären Stroms bei -100 mV, in einem Puffer mit 100 mM NaCl und einem pH-Wert von 7,5 (Na_e / pH_e 7,5/-100 mV). Messungen in dieser Lösung werde ich nachfolgend oft als Messungen unter physiologischen Bedingungen bezeichnen. Während einer Messreihe wurde der Referenzwert mehrmals aufgenommen. Die normierten Amplituden mehrerer Messreihen dienten dann als Grundlage für die Berechnung der Mittelwerte und Standardfehler (Abb. 2.4).

Die Zusammensetzung der Puffer war darauf ausgerichtet, die Konzentrationen von den Ladungsträgern zu variieren, die durch Chr2 geleitet werden. Das sind in erster Linie K^+ , Na^+ , Protonen (H^+) und Ca^{++} . Dementsprechend dienten die verschiedenen pH-Werte dazu, die Ionenleitung unter verschiedenen Protonenkonzentrationen zu messen. Die Lösungen enthielten entweder 100 mM NaCl, 100 mM KCl oder 100 mM NMG-Cl. NMG ist ein organisches Kation, das zu groß ist, um durch Chr2 geleitet zu werden. Damit sollte vor allem der Transport von Protonen sichtbar gemacht werden.

Außerdem gibt es noch eine zweite Stufe der Normierung, um die Veränderung der Ein- und Ausströme unter verschieden äußeren Bedingungen besser sichtbar zu machen. Diese Art der Darstellung wählte ich für die Balkendiagramme, zum Beispiel in Abb. 3.1.2. Dabei wurden die Stromamplituden von I_0 und I_S jeweils auf den Wert bei pH_e 7,5 normiert. Als Referenz für den Einstrom dienten die Amplituden bei -100 mV und für den Ausstrom die bei +50 mV. Zudem wurden dabei die Amplituden für NaCl und NMG-Cl Lösungen unabhängig voneinander normiert. Dadurch wurde der Einfluss verschiedener äußerer Bedingungen auf den Ladungstransport nochmals besonders deutlich hervorgehoben.

Tab. 2.6 Übersicht über die Standardmesslösungen. Zur Justierung des pH-Wertes enthielten die Lösungen zusätzlich entsprechende Mengen NaOH bzw. HCl. Daneben verwendete ich noch Lösungen mit 100 mM KCl, variablen Chloridkonzentrationen sowie Puffer mit verschiedenen Calcium- und Magnesiumkonzentrationen, auf die in den entsprechenden Kapiteln eingegangen wird.

Name	Zusammensetzung / [mM]	pH
Na 7,5 (Referenz) („physiologisch“)	NaCl [100], MgCl [1], CaCl [0,1], MOPS [5]	7,5
Na 9	NaCl [100], MgCl [1], CaCl [0,1], Glycin [5]	9
Na 6	NaCl [100], MgCl [1], CaCl [0,1], MOPS [5]	6
Na 4	NaCl [100], MgCl [1], CaCl [0,1], Citrat [5]	4
NMG 9	NMG-Cl [100], MgCl [1], CaCl, [0,1], Glycin [5]	9
NMG 7,5	NMG-Cl [100], MgCl [1], CaCl, [0,1], MOPS [5]	7,5
NMG 6	NMG-Cl [100], MgCl [1], CaCl [0,1], MOPS [5]	6
NMG 4	NMG-Cl [100], MgCl [1], CaCl [0,1], Citrat [5]	4

Kanalkinetiken

Neben den Stromamplituden wertete ich auch die Kinetiken der Stromspuren aus. Dabei gab es Unterschiede zwischen den Kinetiken, die bei einem kontinuierlichen Lichtpuls und nach einer Laserblitzanregung auftraten (Abb. 2.5).

Bei einem Lichtpuls wurde die Zeit bis zum Erreichen des transienten Stroms (I_P) als Maßstab für die Geschwindigkeit der Kanalöffnung verwendet (t_P), die in diesem Zusammenhang als *on*-Kinetik bezeichnet wird. Der Übergang in die stationäre Phase, der hier auch als Inaktivierung bezeichnet wird, konnte durch monoexponentielle Funktionen angepasst werden. Bei einigen ChR2 Varianten konnte aber eine Verbesserung des Korrelationskoeffizienten erreicht werden, wenn biexponentielle Fits angewendet wurden. Die τ -Werte der Inaktivierung (τ_{in}) und das Verhältnis der Amplituden der langsamen und schnellen Komponente (A_2/A_1) konnten so bestimmt werden. Nach dem Ende der Lichtapplikation schließt der Kanal und der Photostrom geht auf null zurück. Diese sogenannte *off*-Kinetik konnte ebenfalls durch monoexponentielle Funktionen angepasst werden. Bei vielen Mutanten hatte sie aber einen eindeutig biphasischen Verlauf. Durch die Verwendung entsprechender Fitfunktionen konnte meistens eine Verbesserung der Korrelation erreicht werden. Dennoch habe ich von allen *off*-Kinetiken auch den τ -Wert auf Grundlage eines monoexponentiellen Stromabfalls bestimmt, um den qualitativen Vergleich zwischen den verschiedenen ChR2 Varianten zu ermöglichen. Allerdings ist bei einer biexponentiellen Kinetik das Verhältnis der Amplituden von langsamer und schneller Komponente (A_2/A_1) ein wichtiger Parameter für die Modellierung der Stromspuren. Ein weiterer wichtiger Parameter ist das Verhältnis von I_S zu I_0 beziehungsweise von I_S zu I_P , das als Maßstab für die Stärke der Inaktivierung verwendet wurde (vgl. Abb. 3.1.6).

Die Aktivierung von ChR2 mit Laserblitzen resultierte in einem Anstieg auf einen Maximalstrom (I_P), der anschließend auf null zurückfiel. Da die Öffnung des Kanals sehr schnell erfolgte, war die *on*-Kinetik von kapazitiven Strömen überlagert. Somit konnte ihr τ -Wert durch die Anpassung mit monoexponentiellen

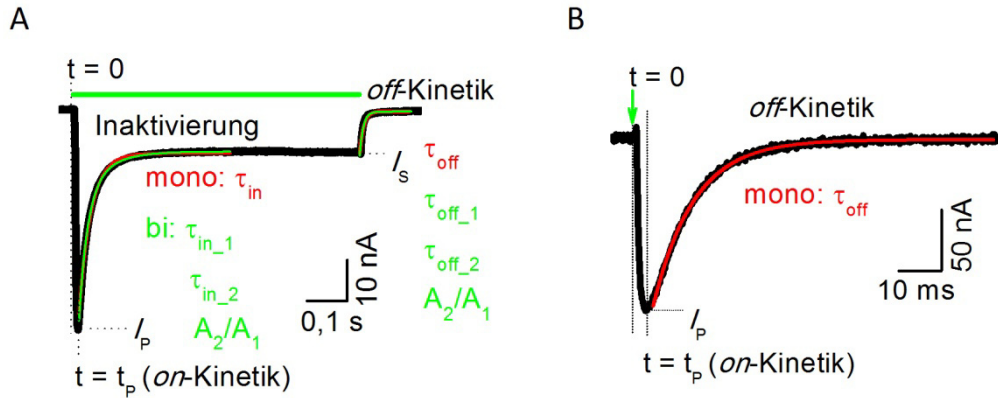


Abb. 2.5 Kanalkinetiken von ChR2. A Anregung von ChR2 bei 100 mM Na_e/ pH_e 7,5/ -100 mV mit einem kontinuierlichen Lichtpuls (grüner Balken). A Beginn der Anregung ist $t = 0$. Der Betrag des Photostroms steigt auf ein transientes Level (I_P). Die Länge des Intervalls von $t = 0$ bis zum Erreichen von I_P ist der Parameter t_p . Der Übergang zum stationären Strom (I_S) kann durch mono- (rot) und biexponentielle (grün) Funktionen gefittet werden (Inaktivierung). Daraus können die entsprechenden τ -Werte und bei biexponentiellen Fits das Verhältnis der Amplituden beider Komponenten bestimmt werden (A_2/A_1). Das gleiche gilt für den Abfall des Stroms nach Ende der Lichtapplikation (*off*-Kinetik). B Anregung von ChR2 unter den gleichen äußeren Bedingungen mit einem 10 ns Laserblitz (grüner Pfeil, $t = 0$). Der Photostrom steigt auf einen Maximalwert (I_P) und fällt mit einer monoexponentiellen Kinetik ab, die mit einer entsprechenden Funktion angepasst wurde. Für die Quantifizierung der Kanalöffnung wurde die Dauer vom Anregungsblitz ($t = 0$) bis zum Erreichen des Maximalstroms ausgewertet (t_p).

Funktionen nicht genau bestimmt werden. Daher diene hier ebenfalls die Länge des Intervalls vom Zeitpunkt der Anregung bis zum Erreichen des Maximalstroms als Maßstab für die Geschwindigkeit der Kanalöffnung (t_p). Im Gegensatz zu den kontinuierlichen Lichtpulsen, fiel der Photostrom nach Blitzanregung monoexponentiell ab. Daher konnte der τ -Wert des Schließvorgangs durch die Anpassung der *off*-Kinetik mit einer entsprechenden Funktion bestimmt werden (τ_{off}) (Abb. 2.5 B). Die kinetischen Parameter wurden in der Regel nur bei einer Spannung von -100 mV für die pH_e-Werte 9; 7,5; 6 und 4 bestimmt.

Eine sehr wichtige Kinetik für das Verständnis des Photozyklus von ChR2 ist die in Kap. 1.2.1 angesprochene *Recovery* Kinetik. Bei zwei unmittelbar aufeinander folgenden, kontinuierlichen Lichtpulsen ist die I_P Amplitude beim zweiten Puls kleiner als beim ersten (Abb. 2.6). Die Erholung des transienten Stroms erfolgt mit einer monoexponentiellen Kinetik, die im Vergleich zu den anderen Kanalkinetiken sehr langsam ist. Um dies sichtbar zu machen, habe ich zwei Lichtpulse auf Proben mit vollständig erholten, transienten Strom appliziert. Die Messungen wurden mehrmals wiederholt, wobei die Dunkelphase zwischen den Pulsen immer länger wurde. Die Amplituden des stationären Stroms waren bei beiden Pulsen annähernd gleich groß. Als Messgröße wurden die Differenzen $I_P - I_S$ für beide Pulse bestimmt (ΔI_1 , ΔI_2). Anschließend wurde das Verhältnis $\Delta I_2 / \Delta I_1$ in Abhängigkeit zur Länge der Dunkelphase in einem YX-Diagramm dargestellt. Bei einer vollständigen Erholung war $\Delta I_2 / \Delta I_1 = 1$, was 100% entspricht (Abb. 3.1.5).

Da die Dunkelphase länger als eine Minute andauernd kann, habe ich für die Bestimmung der Recoverykinetik der Mutanten meist eine Spannung von -75 mV angelegt, um die Belastung für die Zellen gering zu halten.

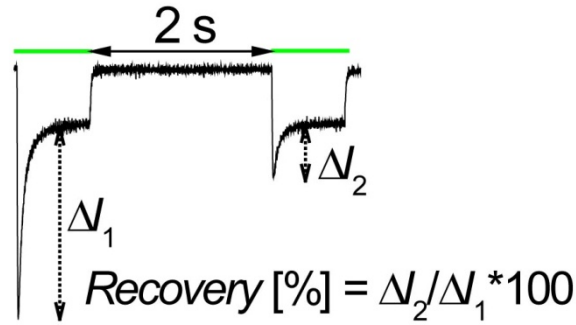


Abb. 2.6 Recovery Kinetik von ChR2 im Doppelpulsexperiment. Der Kanal wurde mit zwei Lichtpulsen (grün) bei 100 mM Na_e/ pH_e 7,5 angeregt. Die Spannung blieb konstant bei -75 mV. Die Pause zwischen den Lichtpulsen beträgt zwei Sekunden. Die *Recovery* des transienten Stroms wird aus dem Verhältnis $\Delta I_2/\Delta I_1$ berechnet, in Prozent angegeben und gegen die Länge der Dunkelphase aufgetragen (vgl. Abb. 3.1.5).

Aktionsspektren

Für die Bestimmung der Wellenlänge des Anregungsmaximums wurden die Proben mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen aktiviert und die dazugehörigen Stromamplituden gemessen. Dafür verwendete ich einen Nd:YAG Laser, wobei die Anregungswellenlängen über einen optisch parametrischen Oszillator einstellbar waren. Die Anzahl der Photonen, die auf die Oocytenmembran traf, war über einen weiten Wellenlängenbereich konstant (Abb. 2.7). Die Proben wurden mit Wellenlängen zwischen 430 nm und 570 nm angeregt. Die resultierenden Maximalströme (I_p) wurden auf den höchsten Wert der Messreihe normiert, dessen Anregungswellenlänge somit das Absorptionsmaximum darstellt. Die Werte für ChR2-WT entsprachen den bekannten Literaturwerten. Um die Verschiebung der Aktionsspektren der Mutanten deutlich zu machen, nahm ich an den jeweiligen Messtagen auch immer ein Spektrum des Wildtyps zur Kontrolle auf.

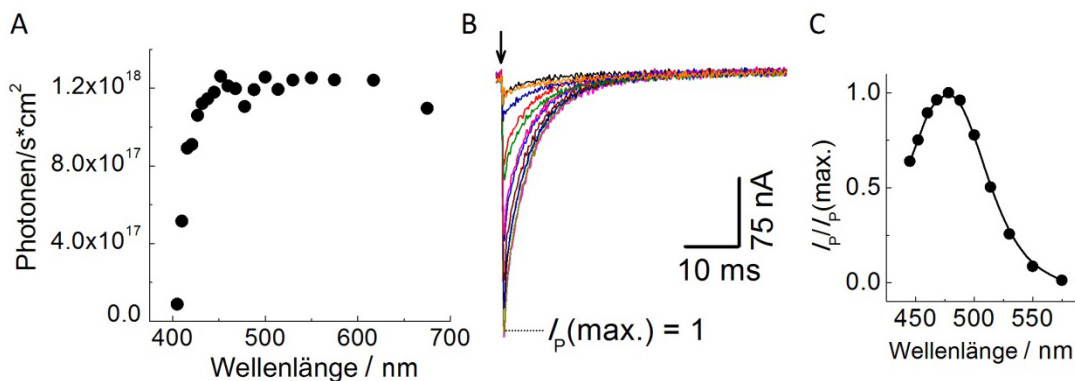


Abb. 2.7 Entstehung eines Aktionsspektrums von ChR2-WT. **A** Laserintensität bei verschiedenen Wellenlängen, angegeben in Photonen/s*cm². Hier wird deutlich, dass die Anzahl emittierter Photonen über einen großen Wellenlängenbereich nahezu konstant ist. Daher wurde bei der Auswertung der Spektren auf wellenlängenabhängige Korrekturfaktoren verzichtet. **B** Stromspuren nach Blitzlichtanregungen mit Wellenlängen zwischen 445 nm und 575 nm. Die Amplituden wurden auf die größte Stromamplitude normiert ($I_p(\max.)$) und gegen die Anregungswellenlänge aufgetragen. **C** Daraus entstand das Aktionsspektrum, das ein Anregungsmaximum bei 477 nm hat.

2.6 Modellierung von IV-Kurven und Stromspuren

2.6.1 Modellierung der IV-Kurven mit dem *Two Barrier* Modell

Durch die Modellierung der Strom/Spannungskurven, sollten die Geschwindigkeitskonstanten für den Transport von Protonen und monovalenten Kationen berechnet werden. Als Grundlage für die Beschreibung dieser Vorgänge diente ein sogenanntes *Two Barrier* Modell. Die genauen Details und die Motivation für die Verwendung dieses Modells werden in Kap. 4.1 ausführlich dargelegt. Grundsätzlich wird damit der Transport von Protonen und monovalenten Kationen über eine Ionenbindungsstelle und zwei Energiebarrieren beschrieben. Mathematisch lässt sich die Amplitude des Photostroms durch eine nichtlineare Gleichung darstellen, die von der Membranspannung, den Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran und den Geschwindigkeitskonstanten des Transports von Protonen und Kationen abhängt. Diese Funktion wurde an die experimentellen Daten angepasst, um einen Satz von sechs Geschwindigkeitskonstanten zu finden. Die Gleichung beinhaltet drei unabhängige Variablen: Die Außenkonzentrationen von Protonen (H_e), die Außenkonzentration der monovalenten Kationen (M_e) und die Spannung E . Die abhängige Variable ist der Photostrom I . Die Innenkonzentrationen der Ladungsträger beeinflussen ebenfalls die Stromamplituden, konnten aber systembedingt nicht variiert werden. Deren cytosolische Konzentrationen sind bekannt (Tab. 4.1) und gingen als feste Größen in die Gleichung ein (H_c , M_c). Statt 0,126 M für M_c zu verwenden ($M_c = [Na^+]_c + [K^+]_c$), wie in Tab. 4.1 angegeben, setzte ich 0,1 M ein, um die geringere Permeabilität von Kaliumionen gegenüber Natriumionen auszugleichen (vgl. Kap. 4.1.1).

Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm Mathematica 5.2, in dem bereits eine Vielzahl von Algorithmen zur Anpassung nichtlinearer Gleichungen implementiert ist. Mathematisch handelt es sich dabei um ein *least squares* Verfahren, bei dem die quadratischen Abweichungen zwischen experimentellen und gefitteten Daten minimiert werden.

Die experimentellen Strom/Spannungskurven von bis zu acht verschiedenen äußeren Bedingungen wurden als Datensatz eingelesen (vier pH_e -Werte, mit und ohne Na^+). Für die Geschwindigkeitskonstanten k^0 wurden jeweils zwei Startwerte festgelegt. Die Berechnung erfolgte mit bis zu einer Million Iterationen. Die im Anhang angegebene Gleichung für den Membranstrom berechnet den Ladungstransport durch einen einzelnen Kanal. Dieser konnte durch die Abschätzung der Gesamtzahl exprimierter Kanäle in den Oocyten ($N_{ChR2} = 1,3 \cdot 10^6$) auf den gemessenen Gesamtstrom skaliert werden (vgl. Kap. 4.1.2).

2.6.2 Modellierung der Photoströme mit einem 4-Zustandsmodell

Die Modellierung der Stromspuren erlaubte die Anpassung der experimentellen Kanalkinetiken von ChR2 an verschiedene 4-Zustandsmodelle. Auf die Details der zwei hier diskutierten Modelle gehe ich in Kap. 4.1.5 näher ein. Damit wurden die

Stromspuren bei -100 mV, während und nach einer Anregung mit einem kontinuierlichen Lichtpuls, simuliert. Wie beim *Two Barrier* Modell ließen sich die Zustandsmodelle durch ein System von Differentialgleichungen darstellen. Allerdings konnte der zeitliche Verlauf der Stromspuren nicht durch eine einzelne Funktion beschrieben werden, da sich das System beim Beginn der Anregung nicht im Gleichgewicht befindet. Daher musste hier das gesamte Differentialgleichungssystem angepasst werden.

Da die Kanalkinetiken unabhängig von der absoluten Größe des Photostroms sind, fittete ich keine experimentellen Stromspuren. Stattdessen simulierte ich ein einzelnes Molekül und passte dessen Kinetik an die jeweiligen Mittelwerte der experimentell bestimmten Kinetiken an. Die Zustandsmodelle beinhalten sieben Geschwindigkeitskonstanten k^0 . Um einen Satz zu finden der die experimentellen Kinetiken wiedergibt, berechnete ich mit Mathematica das Differentialgleichungssystem mit mehreren Kombinationen verschiedener k^0 -Werte. Damit simulierte ich Stromspuren, deren Kinetik berechnet und mit den experimentellen Werten verglichen werden konnte. Diesen Prozess habe ich automatisiert, so dass tausende Kombinationen von Geschwindigkeitskonstanten computergesteuert getestet werden konnten. Das Differentialgleichungssystem wurde während eines Durchlaufes mehrmals berechnet. Das erste Mal für die Phase der Lichtanregung, bei der die Spur auf den transienten Strom anstieg und auf den stationären Strom abfiel. Bei der zweiten Berechnung ging der Gleichgewichtszustand als Anfangsbedingung ein. Allerdings wurden die lichtabhängigen Geschwindigkeitskonstanten auf null gesetzt. Somit konnte ich die *off*-Kinetik nach Beendigung der Lichtapplikation simulieren. Bei der simulierten Spur wurden die Werte für I_P und I_S ausgelesen und das Verhältnis I_S/I_P gebildet. Der Übergang in den stationären Strom wurde mit einer monoexponentiellen Funktion gefittet und der entsprechende τ -Wert berechnet. Die *off*-Kinetik wurde mit einer biexponentiellen Funktion gefittet und somit zwei τ -Werte und das Verhältnis der Amplituden beider Komponenten berechnet (A_2/A_1). Prinzipiell könnten alle sieben Konstanten angepasst werden. Praktisch waren aber nur drei von ihnen frei (k_{12} , k_{22} , k_{23}), um die Berechnungszeit zu verkürzen. Die restlichen Konstanten wurden nach Testläufen, die in die Nähe der jeweiligen experimentellen Werte führten, fixiert. Eine dritte Berechnung des Differentialgleichungssystems wurde vorgenommen, um eine zweite Lichtanregung zu simulieren und somit die langsame Erholung des transienten Stroms sichtbar zu machen. Der Programmcode zur Modellierung mit Mathematica 5.2 wird im Anhang näher erläutert. Die Zustandsmodelle werden in Kap. 4.1.5 detailliert beschrieben.

2.7 Elektrophysiologische Messungen an Neuronen

Im Rahmen eines einmonatigen Forschungsaufenthaltes am Friedrich Miescher Institut (Basel, Schweiz), habe ich elektrophysiologische *in vitro* Untersuchungen an Hippocampusneuronen von Ratten durchgeführt. Dabei arbeitete ich mit der *Patch Clamp* Technik. Ein Hauptunterschied zu *Two Electrode Voltage Clamp*

besteht in der Größe der Zellen. Der Zellkörper einer Pyramidenzelle hat einen Durchmesser von ca. 10 μm - 20 μm . Dadurch ergeben sich einige Unterschiede beim Messaufbau und bei der Messtechnik [36].

Die Zellen stammten aus Kulturen von Gehirnschnitten von Rattenhippocampi, die 4-5 Tage nach der Geburt der Ratten von Daniela Gerosa entnommen und angelegt wurden [46].

Etwa 7 Tage später erfolgte die Transfektion der Zellen mit Plasmiden, die die cDNA-Sequenz von ChR2 trugen. Dabei handelte es sich um einen pCI Vektor (Promega), der neben einer kodierten Ampicillinresistenz auch einen *Synapsin-1* Promotor beinhaltet. Dadurch wurde die spezifische Expression von ChR2 in Neuronen ermöglicht. Mutationen der Wildtypsequenz wurden durch *site directed mutagenesis* realisiert (Kap. 2.4.1). Die Transfektion der Neuronen erfolgte mit einer *Helios gene gun* von BioRad. Dafür wurden die Plasmide an Goldpartikel mit einem Durchmesser von ca. 1,6 μm geheftet (BioRad). Insgesamt verwendete ich 7 μg der pCI-Synapsin-1-ChR2 Vektoren plus 1 μg pCI-Synapsin-1-RFP Vektoren auf 5 mg Goldpartikeln. RFP (*red fluorescent protein*) ist ein lösliches, fluoreszierendes Protein, das zusammen mit ChR2 in die Zellen geschleust wurde, um erfolgreich transfizierte Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren. Mit dieser Transfektionsmethode werden höchstens einige dutzend Zellen pro Kultur transfiziert. Diese sind über die gesamte Zellkultur verstreut und durch die RFP Fluoreszenz in den Zellkörpern, Dendriten und Axonen sehr einfach identifizierbar [39]. 1-2 Wochen nach dem Beschuss der Zellen war das Expressionslevel von ChR2 groß genug, um durch Licht induzierte Aktionspotential auszulösen.

Die Kulturen wurden in eine Messkammer gelegt, durch die eine vorgewärmte (32°C) und mit einem Sauerstoff/Kohledioxid begaste ACSF Lösung strömte (*Artificial cerebrospinal fluid*; mM: 127 NaCl, 25 NaHCO₃, 25 D-Glucose, 2,5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1,25 NaH₂PO₄). Die Lösung enthielt zusätzlich 10 μM NBQX (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion), um anregende synaptische Inputs zu inhibieren. Die Neuronen wurden optisch durch ein BX51 Mikroskop (Olympus) mit einem Wasserimmersionsobjektiv (LUMPlan 60x 0,9NA, Olympus), in Verbindung mit einer gekühlten CCD Kamera (Sensicam QE) detektiert. Die *Patch-Pipette* enthielt eine künstliche, cytosolische Lösung (mM: 135 Kaliumglukonat, 10 HEPES, 4 MgCl₂, 4 Na₂-ATP, 0,4 Na-GTP, 10 Na₂-Phosphokreatin, 3 Ascorbat). Sie wurde mittels elektronisch gesteuerte Mikromanipulatoren (MP-225, Sutter Instruments) auf die Neuronenmembranen gefahren. Die *Voltage Clamp* und *Current Clamp* Messungen erfolgten im *whole cell* Modus und wurden durch einen *MultiClamp 700B* Verstärker (Molecular Devices) kontrolliert. Die optische Anregung von ChR2 erfolgte mit einem 473 nm Laser (Oxxius SLIM-473), der kontinuierlich emittierte und dessen Licht direkt durch das Objektiv auf die gepatchte Zelle appliziert wurde. Die zeitliche Präzision der Lichtapplikation lag im Mikrosekundenbereich und wurde durch einen akustooptischen Modulator (AA Opto-Electronic) kontrolliert.

3. Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von ChR2-WT

3.1.1 Strom/Spannungskurven von verschiedenen ionalen Bedingungen

Die Strom/Spannungskurven (*IV*-Kurven) von ChR2-WT geben die Stromamplituden vom Anfangsstrom (I_0) und stationärem Strom (I_s) bei Spannungen zwischen -125 und 50 mV wieder (Abb. 3.1.1). Die Messungen erfolgten bei vier extrazellulären pH-Werten (pH_e) zwischen pH_e 9 und pH_e 4, in 100 mM NaCl (Na_e) oder 100 mM NMG-Cl (NMG_e). Alle Lösungen enthielten zusätzlich 1 mM MgCl_2 und 0,1 mM CaCl_2 . Sofern dies nicht extra erwähnt wird, blieben die Konzentrationen der bivalenten Ionen konstant. Alle Stromamplituden wurden normiert, wobei der Referenzwert der *IV*-Kurven immer I_s bei -100 mV in Na 7,5 war. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen den *IV*-Kurven von I_s und I_0 und zwischen NaCl und NMG-Cl. Die I_0 -Kurven überschneiden sich in Lösungen mit Natriumionen. Dagegen sind die Kurven des stationären Stroms klar

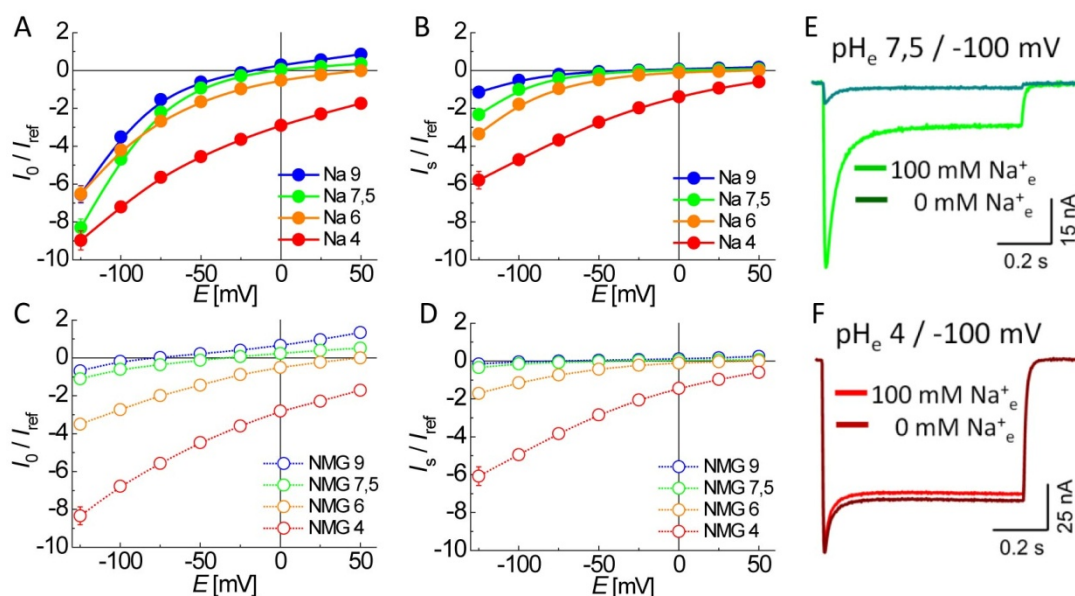


Abb. 3.1.1 Strom/Spannungskurven von ChR2-WT bei vier pH_e -Werten. Die extrazelluläre Lösung enthielt 100 mM NaCl (Na) oder 100 mM NMG-Cl (NMG), sowie 1 mM MgCl_2 und 0,1 mM CaCl_2 . Alle Stromamplituden wurden auf einen Referenzwert normiert $I_{\text{ref}} = I_s$ (Na 7,5/ -100 mV) **A** I_0 und **(B)** I_s Amplituden in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). Auffällig ist, dass sich die I_0 aber nicht die I_s Kurven überschneiden. **C** I_0 und **(D)** I_s Amplituden in NMG-Cl. Die I_0 Kurven ohne extrazelluläres Na^+ sind klar voneinander getrennt. **E** Photoströme in Medien mit und ohne extrazelluläres Na^+ bei pH_e 7,5/ -100 mV und **(F)** pH_e 4/ -100 mV. Bei pH_e 7,5 nahm der Einstrom nach Entfernung von Na^+ deutlich ab. Bei pH_e 4 wurde der Einstrom dagegen größtenteils von Protonen getragen und die Entfernung von Na^+ führte nicht zur Abnahme des Einstroms.

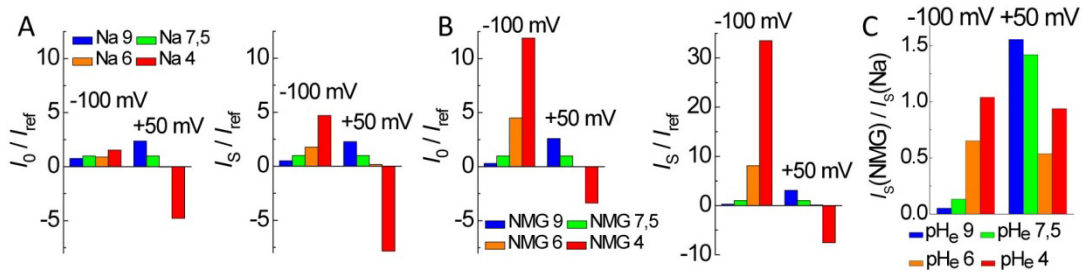


Abb. 3.1.2 pH_e-Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms von ChR2-WT. **A** Links: I_0 , Rechts: I_s . Amplituden bei -100 mV und +50 mV in NaCl bei vier pH_e-Werten (9; 7,5; 6 und 4). Die Amplituden wurden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert (I_{ref}). In Anwesenheit von $[Na^+]_e$ nahm der I_0 Einstrom (-100 mV) kaum zu, wenn die Protonenkonzentration außen stieg. Dagegen nahm der Ausstrom (+50 mV) deutlich ab. **B** Links: I_0 , Rechts: I_s . Amplituden bei -100 mV und +50 mV in NMG-Cl bei vier pH_e-Werten (9; 7,5; 6 und 4). Die Amplituden wurden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert (I_{ref}). In Abwesenheit von $[Na^+]_e$ nahm der I_0 Einstrom deutlich zu, wenn die Protonenkonzentration außen stieg. Dieser Effekt war bei I_s noch stärker. **C** Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV und +50 mV. Mit zunehmender Protonenkonzentration außen nahm der Protonenanteil am Einstrom zu (-100 mV). Bei pH_e 9 und pH_e 7,5 nahm der Ausstrom zu, wenn das Außenmedium kein Na⁺ enthielt (+50 mV).

voneinander getrennt. Bei pH_e 9 und pH_e 7,5 sah man in NMG-Cl gegenüber NaCl eine deutliche Reduktion des Einstroms von Ladungsträgern.

Dies äußerte sich in einer Abnahme der Stromamplituden bei hohen negativen Spannungen, wie z.B. -125 mV. NMG wird nicht von ChR2 geleitet und die extrazellulären Konzentrationen von bivalenten Kationen und Protonen waren unter basischen und neutralen Bedingungen zu klein, um die fehlenden Natriumionen zu ersetzen. Der Anteil von Protonen am Einstrom stieg mit sinkenden pH_e-Werten an und bei pH_e 4 waren die Amplituden in NaCl und NMG-Cl annähernd gleich. Trotzdem nahm der Einstrom bei steigender extrazellulärer Protonenkonzentration in Anwesenheit von Natriumionen kaum zu. Ohne Na⁺ im Außenmedium war die pH_e-Abhängigkeit des Einstroms stärker, was sich in den klar separierten Strom/Spannungskurven in NMG-Cl äußerte. Bei pH_e 9/ +50 mV gab es einen deutlichen Nettoausstrom. Er nahm deutlich ab, wenn die Protonenkonzentration im Außenmedium zunahm. Durch den hohen Protonengradienten, trat bei pH_e 4/ +50 mV schließlich kein Nettoausstrom mehr auf. Um die pH-Abhängigkeit von Ein- und Ausstrom besser zu veranschaulichen, habe ich die I_0 und I_s Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert (Abb. 3.1.2). Bei Na_e/ pH_e 4/ -100 mV war die I_0 Amplitude nur 1,5-mal größer als bei pH_e 7,5 und sie nahm bei pH_e 6 sogar ab. Dagegen gab es beim stationären Strom eine stetige Zunahme einströmender Ladungsträger, wenn die extrazelluläre Protonenkonzentration zunahm. Zum Beispiel war bei pH_e 4/ -100 mV die I_s Amplitude 3,2-mal größer als bei pH_e 7,5.

In NMG-Cl gab es sowohl beim Anfangs- als auch beim stationären Strom eine stetige Zunahme des Einstroms. Bei pH_e 4/ -100 mV waren die Amplituden jeweils 13,1- mal und 31,7-mal größer als bei pH_e 7,5.

Die positiven Amplituden bei pH_e 7,5/ +50 mV dienten als Referenzwert für die pH_e-Abhängigkeit des Ausstroms. Hier war der Vergleich nicht so eindeutig wie bei -100 mV, da sich die Stromrichtung unter sauren Bedingungen umkehrt und bei

pH_e 4/ +50mV ein Nettoeinstrom vorlag. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei I_0 als auch bei I_S zu einer stetigen Abnahme des Ausstroms kam und dass diese Reduktion relativ unabhängig von der extrazellulären Natriumkonzentration war. Zum Beispiel betrug die I_S Amplitude bei Na_e/ pH_e 4/ +50 mV das -7,8-fache des Ausgangswertes bei pH_e 7,5. Bei NMG_e/ pH_e 4/ +50 mV gab es eine Abnahme um das 7,5-fache des Referenzwertes. Die pH_e-Abhängigkeit des Ausstroms war in NaCl und NMG-Cl also sehr ähnlich, während es beim Einstrom erhebliche Unterschiede gab.

Wenn die extrazellulären Natriumionen gegen NMG ausgetauscht wurden, nahmen die Einströme ab, wobei der Grad der Reduktion vom pH_e-Wert des Messpuffers abhing (Abb. 3.1.2 C). Um dies zu verdeutlichen habe ich die Stromamplituden des stationären Stroms bei -100 mV in NaCl und NMG-Cl miteinander verglichen. Bei pH_e 9 war die Abnahme besonders deutlich, wo I_S auf 5% sank. Allerdings nahm dieser Wert bei sinkenden pH_e-Werten immer weiter zu, bis bei pH_e 4 schließlich kein Unterschied mehr zwischen den Amplituden in NaCl- und NMG-Cl auftrat. Bei NMG_e/ pH_e 7,5 und pH_e 6 gingen die I_S Amplituden auf jeweils 13% und 65% des Referenzwertes zurück. Dagegen nahm der Ausstrom in Abwesenheit von Na⁺ etwas zu. Dieser Effekt war bei pH_e 9/ +50 mV besonders deutlich.

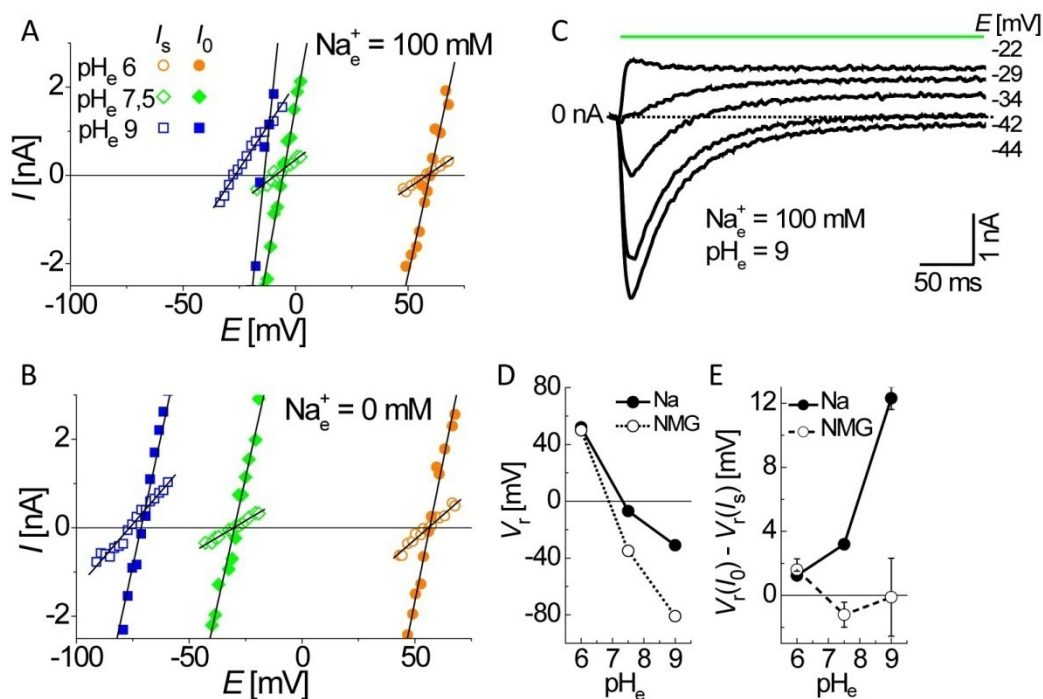


Abb. 3.1.3 ChR2-Umkehrpotentiale bei drei pH_e-Werten. **A** I_0 und I_S gemessen in der Nähe des Umkehrpotentials (V_r) bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün) und 6 (orange) in An- und **(B)** Abwesenheit von extrazellulärem Na⁺. **C** Stromspuren von ChR2-WT bei Na_e/ pH_e 9, aufgenommen bei Spannungen nahe des Umkehrpotentials. I_0 und I_S haben ihre Nulldurchgänge klar erkennbar bei verschiedenen Spannungen. **D** Umkehrpotentiale des stationären Stroms in NaCl und NMG-Cl bei drei pH_e-Werten. Die Umkehrpotentiale verschoben sich mit sinkendem pH_e zu positiven Werten. Bei pH_e 9 und pH_e 7,5 führte die Entfernung von Na⁺ aus dem Außenmedium zu einer negativen Verschiebung von V_r . **E** Differenzen zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_S . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ negativer als $V_r(I_S)$. In NaCl nahm die Differenz mit sinkendem pH_e-Wert ab. In NMG-Cl gab es keine eindeutigen Unterschiede.

3.1.2 Umkehrpotentiale von I_S und I_0

Ein wichtiger Parameter für die Ionenselektivität sind die Umkehrpotentiale (V_r) unter verschiedenen ionalen Bedingungen. Bei dieser Membranspannung sind der Ein- und Ausstrom von Ladungsträgern gleich groß und der messbare Ladungstransport über die Membran gleich null. Der jeweilige Wert des Umkehrpotentials hängt von der Permeabilität, sowie der Innen- und Außenkonzentrationen der geleiteten Ionen ab. Die jeweiligen Werte können aus den IV -Kurven als Schnittpunkte mit der x-Achse ausgelesen werden ($I = 0$). Bei pH_e 7,5 und mit Na^+ im Außenmedium sind die Innen- und Außenkonzentrationen von monovalenten Ionen (Na^+ , K^+) und Protonen etwa gleich (Tab. 4.1), wodurch das Umkehrpotential mit ca. -7 mV nahe bei 0 mV lag. In Abwesenheit von Na^+ war das Umkehrpotential deutlicher negativer und verschob sich auf $V_r = -35$ mV. Dies geht auf den Ausstrom von Kaliumionen zurück, die entlang ihres Konzentrationsgradienten nach außen fließen. Dagegen führte die Erhöhung der äußeren Protonenkonzentration zu einer positiven Verschiebung des Umkehrpotentials. Bei pH_e 6 lag es bei $V_r = +52$ mV. Die Entfernung der Natriumionen aus dem Außenmedium führte hier zu keiner erkennbaren Veränderung mehr, was für einen hohen Anteil einströmender Protonen spricht. Bei pH_e 4 lagen die Umkehrpotentiale bereits jenseits des maximalen Messbereichs von +75 mV. Erwartungsgemäß war V_r bei Na_e/pH_e 9 deutlich negativ verschoben, da hier ein nach außen gerichteter Protonengradient vorlag. Es war aber auch klar erkennbar, dass sich die Umkehrpotentiale für I_S und I_0 unterschieden und um etwa 10 mV auseinander lagen. Um diese Differenzen genauer zu untersuchen, habe ich weitere Strom/Spannungsmessungen nahe am Umkehrpotential und mit kleinen Spannungssprüngen durchgeführt (Abb. 3.1.3). Die Umkehrpotentiale sind in den IV -Plots als Schnittpunkte linearer Fits mit der x-Achse erkennbar. Es bestätigte sich, dass die jeweiligen Werte für I_S und I_0 in NaCl signifikant voneinander abwichen. Dabei war das Umkehrpotential des stationären Stroms negativ verschoben, wobei die Differenz mit 12 mV bei pH_e 9 am größten war und mit steigender, extrazellulärer Protonenkonzentration abnahm. In NaCl lag auch unter basischen Bedingungen kein Gradient für monovalente Kationen vor. Da hier das Umkehrpotential von I_0 näher an 0 mV lag, werden in der Anfangsphase vermutlich mehr Kationen geleitet als im Gleichgewichtszustand. In NMG-Cl gab es keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_S . Eine detaillierte Analyse der Ionenselektivität während der beiden Phasen findet in Kap. 4.1.3 statt.

3.1.3 Einwärtsgleichrichtung des Ladungstransports

ChR2 ist ein Einwärtsgleichrichter. Das bedeutet, dass der Ausstrom im Vergleich zum Einstrom bei vergleichbarer treibender Kraft schwächer ist [1]. Bei *Voltage Clamp* Messungen mit gleich großen Spannungen aber umgekehrten Vorzeichen war der Einstrom größer als der Ausstrom. Als Bezugspunkt dient hierbei nicht die absolute Membranspannung, sondern die positive bzw. negative

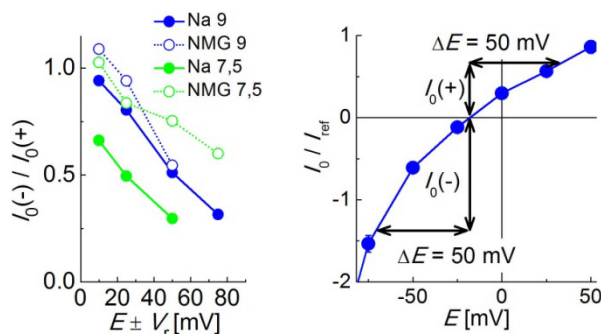


Abb. 3.1.4 Einwärtsgleichrichtung von ChR2. Verhältnis von I_0 -Einstrom zu I_0 -Ausstrom bei gleichen Spannungen ober- und unterhalb des Umkehrpotentials. Die Messungen wurden in NaCl und NMG-Cl bei pH_e 9 (blau) und pH_e 7,5 (grün) durchgeführt. Ein Wert von 1 entspricht einem gleichen Betrag von Ein- und Ausstrom. Mit größerer Entfernung zum Umkehrpotential nimmt die Einwärtsgleichrichtung zu. Sie ist besonders deutlich in Lösungen mit NaCl bei pH_e 7,5.

Spannungsdifferenz zum jeweiligen Umkehrpotential. Um dies für ChR2 zu verdeutlichen, habe ich, sofern vorhanden, den Einstrom und den Ausstrom bei Spannungen von ± 10 , 25, 50 und 75 mV, relativ zum Umkehrpotential ausgelesen und deren Verhältnis zueinander berechnet. Ein Wert von 1 bedeutet, dass positiver und negativer Strom gleich groß sind. Dagegen bedeutet ein Wert von 0,5, dass die Amplitude des Ausstroms halb so groß wie des Einstroms war. Bei ChR2 nahm die Einwärtsgleichrichtung mit steigender äußerer Protonenkonzentration zu und mit sinkender äußerer Natriumkonzentration ab (Abb.3.1.4).

3.1.4 Recovery Kinetik des transienten Stroms

Bei Anregungen mit Lichtpulsen stieg der Betrag des ChR2 Photostroms schnell auf das transiente Level I_p und fiel dann auf den kleineren stationären Strom I_s ab. Bei zwei hintereinander applizierten Pulsen war die Amplitude des zweiten transienten Stroms kleiner. Die *Recovery* Kinetik des transienten Stroms ist monoexponentiell und war bei niedrigen pH_e-Werten sowie hohen Spannungen

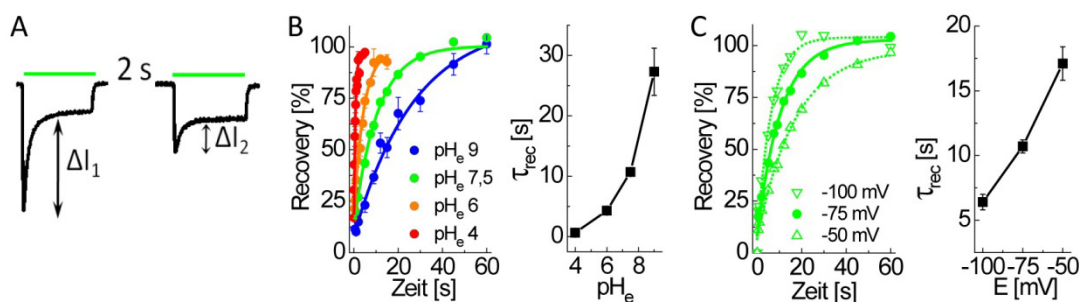


Abb. 3.1.5 Recovery Kinetik von ChR2-WT. **A** Membranstrom im Doppelpulsexperiment mit 2 s Pause zwischen den Anregungspulsen (grün). Die Spannung betrug konstant -75 mV. Die Erholung des transienten Stroms ergibt sich durch das Verhältnis von ΔI_2 zu ΔI_1 . **B** *Recovery* Kinetik bei vier pH_e-Werten, bei -75 mV. Die Datenpunkte wurden durch monoexponentielle Funktionen angepasst und deren τ -Werte berechnet (rechts). Die Erholung des transienten Stroms beschleunigte sich mit sinkendem pH_e. **C** *Recovery* Kinetik bei pH_e 7,5/ -100 mV, -75 mV, -50 mV. Die Datenpunkte wurden durch monoexponentielle Funktionen angepasst und die τ -Werte ermittelt (rechts). Die Erholung des transienten Stroms beschleunigte sich bei negativen Spannungen.

schneller (Abb. 3.1.5) (vgl. [1]). Bei pH_e 7,5/ -100 mV betrug ihr τ -Wert 6,4 s, bei -75 mV ca. 10,7 s und bei -50 mV bereits 17,1 s. Die pH_e -Abhängigkeit der *Recovery* Kinetik wurde bei einer Spannung von -75 mV ausgelesen, um die Belastung für die Zelle möglichst gering zu halten. Unter basischen Bedingungen betrug der τ -Wert 27,3 s und bei pH_e 4 hatte die *Recovery* Kinetik einen τ -Wert von nur 0,7 s.

3.1.5 ChR2 Kinetiken bei Anregung mit Lichtpulsen

Um die pH_e -Abhängigkeit der ChR-2 Kinetiken zu bestimmen, habe ich verschiedene Parameter aus den jeweiligen Stromspuren bei -100 mV ausgelesen (Abb. 3.1.6). Wegen der schnellen Öffnung von ChR2 überlagerte sich die *on*-Kinetik mit kapazitiven Strömen. Für die Geschwindigkeit der Kanalöffnung habe ich deshalb das Intervall (t_p) vom Beginn der Lichtapplikation bis zum Erreichen des transienten Stroms (I_p) als Maßstab ausgelesen. Die *on*-Kinetik war mit 11,3 ms bei pH_e 9 am schnellsten und wurde unter neutralen und schwach sauren (pH_e 6) Bedingungen langsamer, um bei pH_e 4 wieder zu beschleunigen.

Die Übergangskinetik zum stationären Strom, die hier als Inaktivierung bezeichnet wird, konnte durch monoexponentielle Funktionen gefittet werden. Die resultierenden τ -Werte (τ_{in}) dienten als Maß für die Geschwindigkeit der Inaktivierung. Wie bei der *on*-Kinetik war sie bei pH_e 9 mit 30,7 ms am schnellsten,

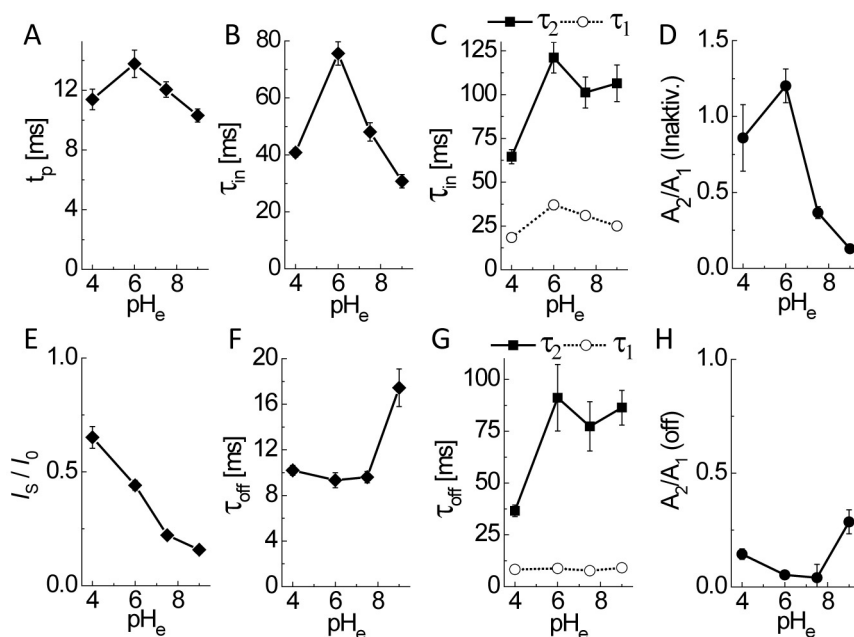


Abb. 3.1.6 pH_e-Abhängigkeit der ChR2-WT Kinetiken bei -100 mV, pH_e 9; 7,5; 6 und 4, bei Anregung mit Lichtpulsen. **A** Länge des Intervalls vom Anregungsbeginn bis zum transienten Strom (I_p). **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen und **(C)** biexponentiellen Fits sowie **(D)** das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **E** Verhältnis von I_s zu I_0 . Der Anteil des stationären Stroms stieg bei sinkendem pH_e. **F** τ -Werte der *off*-Kinetik bei monoexponentiellen und **(G)** biexponentiellen Fits sowie **(H)** das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. Der Anteil der langsamen Komponente war bei pH_e 9 besonders hoch. Dadurch schließt sich der Kanal hier besonders langsam.

wurde bei pH_e 7,5 und pH_e 6 langsamer und beschleunigte wieder bei pH_e 4. Die monoexponentiellen Fits der Inaktivierung vereinfachten den Vergleich zu anderen Mutanten und Bedingungen und lieferten bei ChR2-WT akzeptable Korrelationen (Abb. 3.1.7). Allerdings trat unter bestimmten Bedingungen eine zweite, langsame Komponente auf, deren τ -Wert (τ_2) bei pH_e 6 und pH_e 7,5 ein Maximum hatte. Außerdem war die Amplitude der langsamen Komponente (A_2) bei pH_e 6 mit einem Anteil von 1,2 größer als die der schnellen Komponente (A_1).

Die *off*-Kinetiken der Photoströme wurden zunächst mit monoexponentiellen Funktionen gefittet. Die beste Korrelation gab es bei pH_e 4 und pH_e 6. Mit zunehmenden pH_e verloren diese Kinetiken aber ihren monoexponentiellen Charakter. Bei pH_e 9 waren die Abweichungen besonders deutlich (Abb. 3.1.7-B). Insgesamt war die Geschwindigkeit der schnellen Komponente (A_1 , τ_1) nur schwach pH-abhängig. Dagegen wurde die langsame Komponente (A_2 , τ_2) bei abnehmender Protonenkonzentration langsamer und dominanter. So betrug ihr Anteil bei pH_e 9 fast 30% und sie hatte einen τ -Wert von 86 ms. Dadurch dauerte das Schließen des Kanals unter basischen Bedingungen vergleichsweise lange. Bei pH_e 4 betrug der Anteil von A_2 nur noch 14% und die langsame Komponente hatte hier einen τ -Wert von 37 ms.

Das Verhältnis zwischen I_s und I_0 wurde ebenfalls als kinetischer Parameter betrachtet, da die Kinetiken den Übergang in den Gleichgewichtszustand beeinflussen und damit auch einen Beitrag zur Größe des stationären Stroms leisten. Der Anteil des stationären Stroms erreichte bei pH_e 9 mit 16 % sein Minimum. Beim Absenken des extrazellulären pH-Wertes stieg er aber kontinuierlich bis auf 65% bei pH_e 4 an.

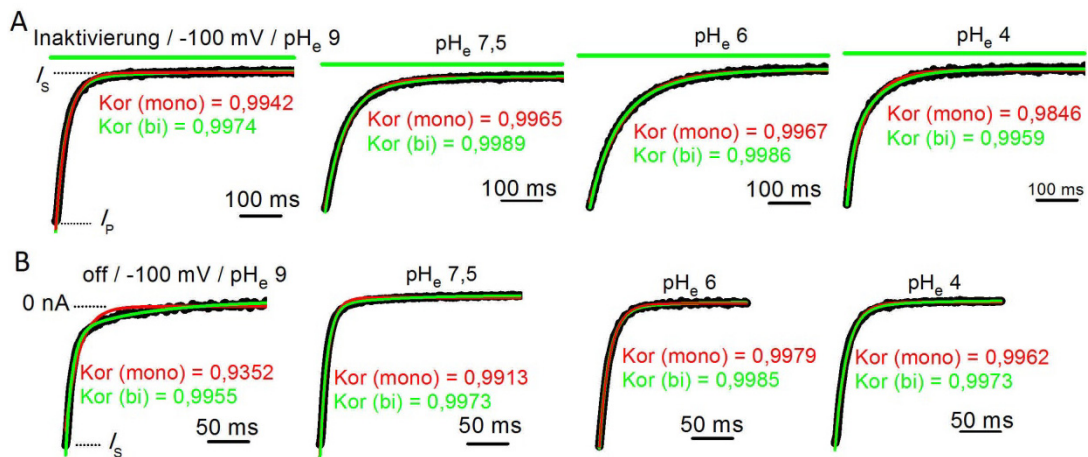


Abb. 3.1.7 ChR2-WT Ströme während und nach der Anregung mit Lichtpulsen. Die Stromspuren (schwarz) wurden bei -100 mV und vier pH_e -Werten aufgenommen. **A** Hier wurde der Übergang vom transienten (I_P) zum stationären Strom (I_S) vergrößert dargestellt und durch mono- (rot) und biexponentielle (grün) Funktionen angepasst (Lichtaktivierung: grüner Balken). Mit *Kor* wurden die entsprechenden Korrelationskoeffizienten angegeben. **B** Nach Ende der Aktivierung fiel der Photostrom (schwarz) von I_S auf 0 nA zurück und wurde durch mono- (rot) und biexponentielle (grün) Funktionen angepasst. Oft reichen monoexponentielle Funktionen zur Beschreibung der Kinetiken. Bei der pH_e 9 *off*-Kinetik wird die Abweichung aber besonders offensichtlich.

3.1.6 Schnelle Kinetiken nach Nanosekunden-Laserblitzaktivierung

Die Kinetiken, die bei der Anregung mit Lichtpulsen gemessen wurden, gaben die tatsächlichen Kanalkinetiken nur qualitativ wieder. Beispielsweise konnte unter diesen Bedingungen nicht die wahre *on*-Kinetik gemessen werden, da es wegen der anhaltenden Aktivierung zu keiner synchronen Aktivierung der Kanäle kam. Des Weiteren stellte die *off*-Kinetik nach einem längeren Lichtpuls die Rückkehr aus einem Gleichgewichtszustand verschiedener Intermediate des Photozyklus dar. Dagegen wurde durch die Applikation eines Laserblitzes im Nanosekundenbereich eine synchrone Aktivierung erreicht. Die Kanäle durchliefen den Photozyklus genau einmal und die gemessene Aktivität bildete die Kinetik eines Durchlaufs ab. Da sich auch hier die *on*-Kinetik mit schnellen kapazitiven Strömen überlagerte, habe ich die Zeit von der Lichtapplikation bis zum Erreichen des maximalen, transienten Stroms (I_P) als Maß für die *on*-Kinetik ausgelesen (t_P) (Abb. 3.1.8-B). Diese Intervalle waren erheblich kürzer als bei der Anregung mit Lichtpulsen und lagen zwischen 1 ms und 2,5 ms. Trotzdem konnte ich die gleiche Tendenz beobachten. Die Kanalöffnung war bei pH_e 4 schnell und wurde bei pH_e 6 und pH_e 7,5 zunächst langsamer, um bei pH_e 9 wieder zu beschleunigen. Eine ähnliche Tendenz gab es auch bei der *off*-Kinetik, die bei allen pH_e -Werten monoexponentiell war. Die τ_{off} -Werte lagen zwischen 9 ms und 10 ms. Wegen des Standardfehlers sind die Änderungen aber nicht signifikant. Hier fiel auf, dass diese Kinetik, bezüglich ihrer Geschwindigkeit und pH_e -Abhängigkeit mit der schnellen Komponente der biexponentiellen *off*-Kinetik nach Anregung mit Lichtpulsen übereinstimmte.

Zudem habe ich bei den Lasermessungen die Spannungsabhängigkeit der Kanalkinetiken näher untersucht. Leider konnte ich nicht für jede Spannung den entsprechenden Wert auslesen, da die Photoströme in der Nähe des Umkehrpotentials sehr klein werden. Generell waren die Kanalkinetiken bei allen pH_e -Werten spannungsabhängig (Abb. 3.1.8-D). Die *off*-Kinetik wurde in Richtung

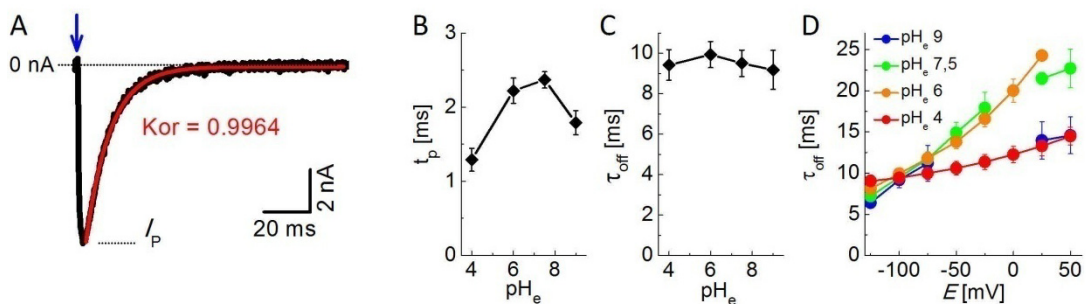


Abb. 3.1.8 Laserblitzaktivierung von Chr2-WT. **A** Photostrom bei pH_e 7,5/ -100 mV nach Anregung mit einem 10 ns Laserblitz (Pfeil, 470 nm). Im Gegensatz zur Anregung mit Lichtpulsen schließt der Kanal nach Anregung mit einem Laserblitz immer mit einer monoexponentiellen Kinetik (rot, Kor: Korrelationskoeffizient des Fits). **B** Länge des Intervalls von der Aktivierung bis zum Erreichen des Maximalstroms I_P . Die Kanalöffnung war bei pH_e 9 und pH_e 4 am schnellsten. **C** τ -Werte der *off*-Kinetik bei -100 mV. Bei dieser Spannung war die Geschwindigkeit mit der sich der Kanal schließt relativ unabhängig vom pH_e -Wert. **D** Spannungsabhängigkeit der *off*-Kinetik bei vier pH_e -Werten. Der Kanal schließt sich bei positiveren Spannungen langsamer.

positivere Spannung immer langsamer. Beispielsweise betrug ihr τ -Wert bei pH_e 7,5/ -125 mV ca. 7,2 ms. Die positive Amplitude bei +50 mV fiel wesentlich langsamer ab und hatte mit ca. 22,7 ms einen dreimal größeren τ -Wert. Das Intervall bis zum Erreichen des transienten Stroms war ebenfalls spannungsabhängig. Hier ergab sich ein nicht einheitliches Bild. Zunächst wurden die Kinetiken mit positiverer Spannung stetig langsamer. Jedoch beschleunigte sich die Kanalöffnung wieder bei positiven Photoströmen. Zum Beispiel verlängerte sich das Intervall von 2 ms bei pH_e 7,5/ -125 auf 2,7 ms bei einer Spannung von -50 mV. Dagegen erreichte der transiente Strom bei +50 mV sein Maximum bereits nach 2,2 ms.

3.1.7 Leitung bivalenter Kationen

Die Leitfähigkeit von ChR2 gegenüber bivalenten Kationen wurde mit verschiedenen extrazellulären Calcium- und Magnesiumkonzentrationen mit und ohne Natriumionen im Außenmedium, bei pH_e 7,5 gemessen. Da die ChR2-WT Ströme bei diesen Experimenten teilweise besonders klein waren, habe ich zusätzliche Messungen mit den Mutanten T159C und H134R durchgeführt, da sie

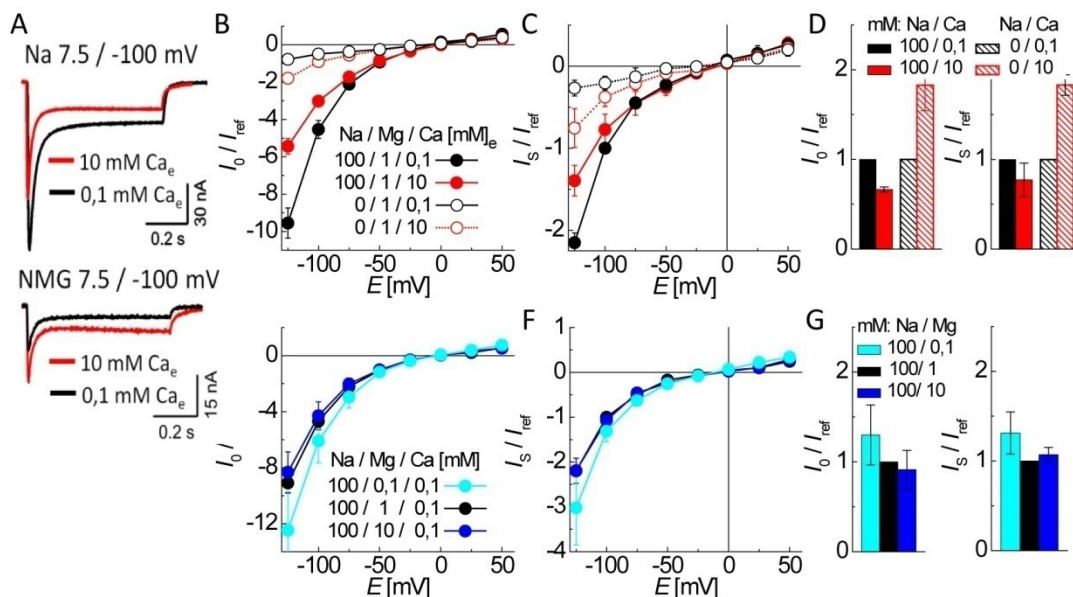


Abb. 3.1.9 Leitung bivalenter Kationen durch ChR2-WT bei pH_e 7,5. **A** Oben: Photoströme von ChR2-WT in NaCl bei pH_e 7,5/ -100 mV. Die Medien enthielten 0,1 mM $CaCl_2$ (schwarz) oder 10 mM $CaCl_2$ (rot) sowie je 1 mM $MgCl_2$. Der Einstrom nahm bei höherer Calciumkonzentration ab. Unten: Gleiche Bedingungen aber ohne Na^+ in der Messlösung. Der Einstrom nahm bei höherer Calciumkonzentration zu. **B** I-V-Kurven von I_0 und **(C)** I_S in NaCl und NMG-Cl Lösungen, die entweder 0,1 mM $CaCl_2$ (schwarz) oder 10 mM $CaCl_2$ (rot) enthielten sowie je 1 mM $MgCl_2$. **D** Links: I_0 , Rechts: I_S . Vergleich des Einstroms bei -100 mV in Lösungen mit 10 mM (rot) oder 0,1 mM $CaCl_2$ (schwarz), mit und ohne Na^+ im Außenmedium. Die Amplituden wurden jeweils auf den Wert mit 0,1 mM $CaCl_2$ normiert. In NaCl nahm der Einstrom bei hohen Calciumkonzentrationen ab, in NMG-Cl zu. **E** I-V-Kurven von I_0 und **(F)** I_S in NaCl die entweder 0,1 mM $MgCl_2$ (hellblau), 1 mM $MgCl_2$ (schwarz) oder 10 mM $MgCl_2$ (blau) enthielten sowie jeweils 0,1 mM $CaCl_2$. **G** Links: I_0 , Rechts: I_S . Vergleich der Stromamplituden bei -100 mV in Lösungen mit den drei Magnesiumkonzentrationen. Die Amplituden wurden jeweils auf den Wert bei 1 mM $MgCl_2$ (schwarz) normiert. Bei I_0 und I_S nahm der Einstrom mit steigender extrazellulärer Magnesiumkonzentration tendenziell ab.

wesentlich größere Photoströme lieferten. Dabei fielen vor allem zwei Dinge auf:

1. In den NaCl nahm der Einstrom von Ladungsträgern bei -100 mV signifikant ab, wenn die extrazelluläre Calciumkonzentration anstieg.
2. In NMG-Cl nahm der Einstrom von Ladungsträgern mit steigender Calciumkonzentration zu (Abb. 3.1.9-A).

Um dies zu verdeutlichen habe ich die Stromamplituden von I_0 und I_S bei -100 mV auf die Werte normiert, die in Lösungen mit 1 mM MgCl_2 und 0,1 mM CaCl_2 gemessen wurden. In Anwesenheit von Na^+ reduzierten sich sowohl I_0 als auch I_S auf 70-80% nachdem die Calciumkonzentration von 0,1 auf 10 mM anstieg. Umgekehrt gab es eine durchschnittliche Zunahme von etwa 70%, wenn die Messlösungen kein Na^+ enthielten (Abb. 3.1.9-D). Vermutlich blockieren Calciumionen bei hohen Konzentrationen die Bindung von Na^+ , werden aber selbst schlechter geleitet. In Na 7,5 wird der Einstrom größtenteils von Natriumionen getragen. Wenn sie durch die Calciumbindung blockiert werden, nimmt der Einstrom ab. Die Resultate waren für ChR2-WT, H134R und T159C für I_0 und I_S annähernd gleich. Mit einer bemerkenswerten Ausnahme: Der stationäre Strom von T159C stieg bei einer Calciumkonzentration von 10 mM um das 3-fache an (Abb. 3.1.11-A). Diese Zunahme muss aber nicht auf einer höheren Calciumleitfähigkeit während der stationären Phase beruhen. Während der Messungen habe ich auf

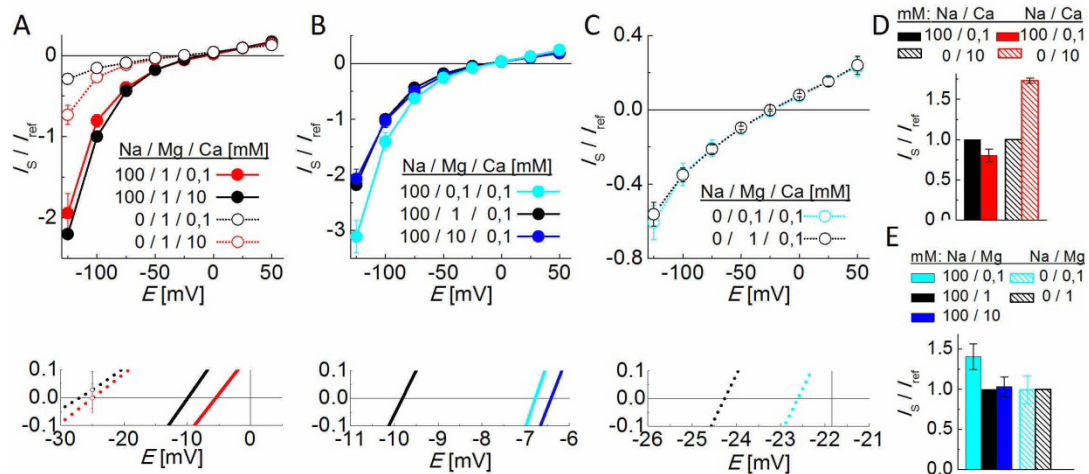


Abb. 3.1.10 Leitung bivalenter Kationen durch H134R bei pH_e 7,5. **A** Oben: I_V -Kurven von I_S in NaCl und NMG-Cl Lösungen, die entweder 0,1 mM CaCl_2 (schwarz) oder 10 mM CaCl_2 (rot) enthielten sowie je 1 mM MgCl_2 . Unten: Nulldurchgänge von I_S . Bei der Erhöhung der Calciumkonzentration wurde das Umkehrpotential in NaCl und NMG-Cl positiv verschoben. **B** Oben: I_V -Kurven von I_S in NaCl oder **(C)** NMG-Cl Lösungen die entweder 0,1 mM MgCl_2 (hellblau), 1 mM MgCl_2 (schwarz) oder 10 mM MgCl_2 (blau) enthielten sowie jeweils 0,1 mM CaCl_2 . Unten: Magnesium hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Umkehrpotential, da die Verschiebung nicht eindeutig mit der Magnesiumkonzentration korrelierte. **D** Vergleich von I_S bei -100 mV in Lösungen mit 10 mM CaCl_2 (rot) oder 0,1 mM CaCl_2 (schwarz). Normierung auf den jeweiligen Wert bei 0,1 mM CaCl_2 . In NaCl nahm der Einstrom bei hohen Calciumkonzentrationen ab, in NMG-Cl zu. Vergleich von I_S bei -100 mV in Lösungen mit 1 mM (schwarz), 0,1 (hellblau) oder 1 mM MgCl_2 (blau). Normierung auf den jeweiligen Wert bei 1 mM MgCl_2 (schwarz). In NaCl nahm der Einstrom bei höherer Magnesiumkonzentration tendenziell ab. In NMG-Cl gab es keine signifikante Änderung.

einen cytosolischen Chelator verzichtet. Allerdings enthält die Oocytenmembran calciumaktivierte Chloridkanäle [47]. Bei der geringen Standardcalciumkonzentration von 0,1 mM spielt dieser Faktor eigentlich kaum eine Rolle. Allerdings konnte ich beim Wildtyp, bei hohen Calciumkonzentrationen in NMG-Cl eine schwache aber stetige Zunahme des stationären Einstroms beobachten (Abb. 3.1.9-A). Vermutlich wurden durch den Einstrom von Calciumionen Chloridkanäle aktiviert, wodurch bei -100 mV Anionen aus der Zelle strömten und den stationären Photostrom überlagerten. Die Stromamplituden von T159C waren wesentlich größer als die des Wildtyps. Deswegen war die Aktivierung der Chloridkanäle hier vermutlich entsprechend stärker, woraus ein größerer Ausstrom von Chloridionen resultierte. Dadurch wurde der Betrag des stationären Stroms dementsprechend vergrößert (Abb. 3.1.11-B). Wie man anhand der Stromspuren in Abb. 3.1.11-B sehen kann, war dieser Effekt in Anwesenheit von extrazellulärem Na^+ und bei niedrigen Calciumkonzentrationen schwächer. Daraus folgt indirekt, dass der Calciumeinstrom unter diesen Bedingungen geringer war. Für eine Quantifizierung der Calciumleitfähigkeit müssten die Experimente in Anwesenheit eines cytosolischen Chelators wie BAPTA wiederholt werden. Alternativ könnten auch Messungen in HEK-Zellen durchgeführt werden, da diese keine calciumaktivierten Chloridkanäle besitzen.

Unter hohen Magnesiumkonzentrationen kam es in NaCl ebenfalls zur Reduktion des Einstroms. Im Gegensatz zu Ca^{2+} , kam es aber zu keiner signifikanten Steigerung des Einstroms in NMG-Cl. Dies wurde vor allem bei T159C deutlich (Abb. 3.1.11-C). Bei Magnesiumkonzentrationen zwischen 0,1 mM und 10 mM veränderte sich der Einstrom kaum. Vermutlich bindet Mg^{2+} an den Kanal wird aber wesentlich schlechter geleitet als Ca^{2+} .

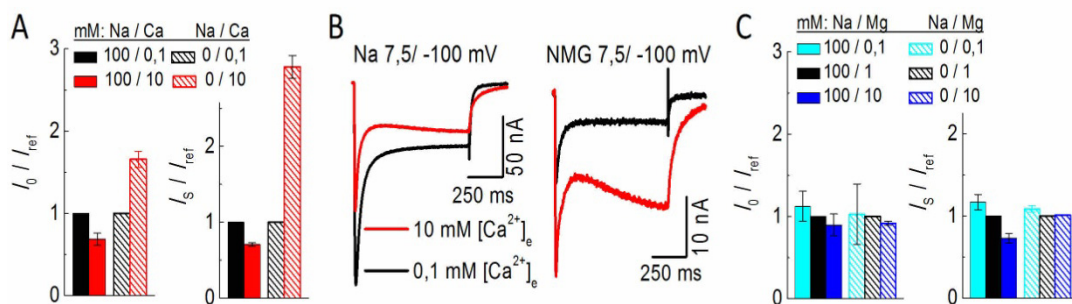


Abb. 3.1.11 Leitung bivalenter Kationen durch T159C bei pH_e 7,5 **A** Links: I_0 , Rechts: I_S . Vergleich des Einstroms bei -100 mV in Lösungen mit 10 mM (rot) oder 0,1 mM CaCl_2 (schwarz), mit und ohne Na^+ im Außenmedium. Die Amplituden wurden jeweils auf den Wert mit 0,1 mM CaCl_2 normiert. In NaCl nahm der Einstrom bei hohen Calciumkonzentrationen ab, in NMG-Cl zu. Bei I_S war die Zunahme signifikant größer als bei I_0 und ChR2-WT und H134R. **B** Links: Photoströme in NaCl bei pH_e 7,5/ -100 mV. Die Medien enthielten 0,1 mM (schwarz) oder 10 mM CaCl_2 (rot) sowie je 1 mM MgCl_2 . Der Einstrom nahm bei höherer Calciumkonzentration ab. Rechts: Gleiche Bedingungen aber ohne Na^+ in der Messlösung. Durch die großen Stromamplituden von T159C (vgl. Abb. 3.6.1) konnte insbesondere in NMG-Cl viel Ca^{++} in die Zellen strömen. Dadurch kam es zu einer starken Aktivierung von Ca^{++} aktivierten Chloridkanälen. Der Ausstrom von Chlorid führte zu einer virtuell, stärkeren Zunahme des Einstroms. **C** Links: I_0 , Rechts: I_S bei -100 mV in Lösungen mit 1 mM (schwarz), 0,1 (hellblau) oder 1 mM MgCl_2 (blau). Normierung auf den jeweiligen Wert bei 1 mM MgCl_2 . In NaCl nahm der Einstrom bei höherer Magnesiumkonzentration ab. In NMG-Cl gab es dagegen keine signifikante Änderung.

Das Umkehrpotential verschob sich in Lösungen mit hoher Calciumkonzentration tendenziell zu positiveren Werten. Die Verschiebungen blieben jedoch stets im unteren, einstelligen Millivoltbereich. Der Einfluss von Mg^{2+} auf das Umkehrpotential konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Hier kam es zu keiner stetigen positiven Verschiebung bei Erhöhung der Magnesiumkonzentration. Die beobachteten Schwankungen, die beispielhaft für H134R in Abb. 3.1.10 gezeigt werden, sind vermutlich eher statistischer Natur.

3.1.8 Transport von Kaliumionen durch Chr2

Um die Ionenselektivität von K^+ und Na^+ genauer miteinander vergleichen zu können als in den vorherigen Studien [1], habe ich Experimente mit 100 mM KCl statt NaCl im Außenmedium durchgeführt (Abb. 3.1.12). Bei pH_e 9, pH_e 7,5 und pH_e 6 nahm dadurch der Einstrom ab. Die Amplituden des stationären Stroms bei -100 mV reduzierten sich in KCl gegenüber den Lösungen mit NaCl auf jeweils 56%, 71% und 81%. Die Umkehrpotentiale des stationären Stroms wurden etwas negativer. Bei pH_e 7,5 gab es eine Verschiebung von $V_r = -7$ mV (Na_e) auf $V_r = -14$ mV (K_e). Bei pH_e 9 lagen die Umkehrpotentiale von I_s und I_0 in KCl bei jeweils -38 mV und -28 mV. Damit waren sie gegenüber NaCl ebenfalls negativ verschoben. Dagegen gab es bei pH_e 6 keinen signifikanten Unterschied mehr.

Offensichtlich ist die Permeabilität von K^+ kleiner als die von Na^+ . Eine detaillierte Diskussion zur Leitfähigkeit von monovalenten Kationen findet in der Diskussion in Kap. 4.1.1 statt.

3.1.9 Strom/Spannungsmessung mit variierender Chloridkonzentration

In zwei Testreihen habe ich als Ersatz für die extrazellulären Chloridionen Aspartat und Sulfat verwendet (Abb. 3.1.13). Die Natriumkonzentration blieb unverändert bei 100 mM. Bei pH_e 7,5 mit 80 mM Natriumaspartat und 20 mM NaCl im Außenmedium reduzierte sich der stationäre Strom bei -100 mV zunächst auf 79% gegenüber NaCl. Ohne Chlorid im Außenmedium betrug dessen Amplitude nur

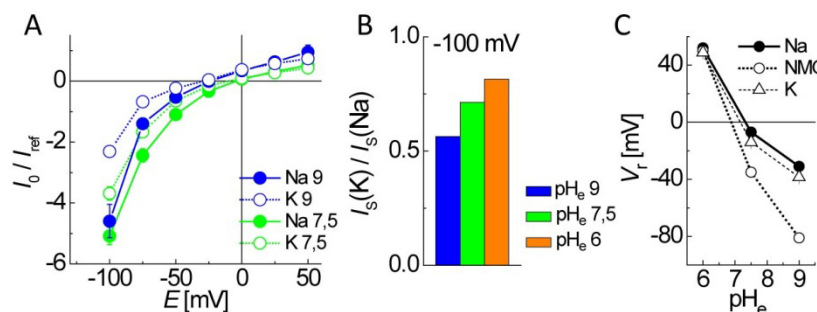


Abb. 3.1.12 Kaliumleitung durch Chr2-WT. **A** I/V -Kurven in Lösungen mit 100 mM NaCl (Na) oder 100 mM KCl (K) bei pH_e 9 (blau) und pH_e 7,5 (grün). **B** Verhältnis von I_s in KCl zu I_s in NaCl bei -100 mV. Die Einstrome waren mit K^+ im Außenmedium verhältnismäßig kleiner, insbesondere unter basischen Bedingungen. **C** Vergleich der I_s Umkehrpotentiale in NaCl, KCl und NMG-Cl. Beim Austausch von Na^+ gegen K^+ kam es zu leichten negativen Verschiebungen von V_r .

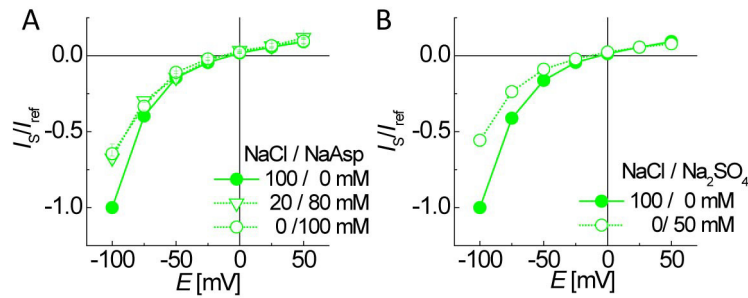


Abb. 3.1.13 ChR2-WT in Natriumaspartat und Na₂SO₄-Lösungen bei pH_e 7,5. Bei diesen Messungen wurden die extrazellulären Chloridionen durch (A) Aspartat oder (B) Sulfat ersetzt. Dies führte zur Reduktion des Einstroms und zur negativen Verschiebung der Umkehrpotentiale.

65% des Ausgangswertes. Das Umkehrpotential verschob sich dabei leicht von -7 mV auf -13 mV. Die gleichen Beobachtungen konnten bei pH_e 9 und pH_e 6 gemacht werden. Beim Übergang von 100 mM Cl_e auf 0 mM Cl_e reduzierte sich die stationäre Amplitude bei -100 mV jeweils auf 59% und 69%. Beim Einsatz einer 50 mM Natriumsulfatlösung (pH 7,5) gab es ebenfalls eine Reduktion des Einstroms und eine Verschiebung des Umkehrpotentials von -7 mV auf -13 mV. Diese Ergebnisse geben keine Hinweise auf eine Chloridleitung von ChR2, da sich das Umkehrpotential sonst in Richtung positiver Werte verschoben hätte. Außerdem müsste der Photostrom bei -100 mV in Lösungen mit Aspartat oder Sulfat gegenüber NaCl größer werden, da der nach außen gerichtete Chloridgradient zunahm.

3.2 Charakterisierung von E90 Mutationen

Glutamat 90 ist Teil des Glutamatmotivs, das für Channelrhodopsine charakteristisch ist, aber nicht in anderen mikrobiellen Rhodopsinen wie Bakteriorhodopsin, Halorhodopsin oder Sensory Rhodopsin auftritt. Die genaue Lokalisation von E90 im Homologiemodell ist nicht möglich, da die ersten zwei Helices von ChR2 die geringste Homologie zu BR aufweisen (Abb. 1.8). Möglicherweise spielen diese Reste eine entscheidende Rolle bei der Kanalfunktion von ChR2. Um den Einfluss von E90 zu untersuchen, habe ich diesen Rest gegen Glutamin, Aspartat, Histidin, Alanin und Leucin ausgetauscht.

3.2.1 E90Q

Diese Mutante zeigte einige ungewöhnliche Eigenschaften im Vergleich zu ChR-WT. Erste Untersuchungen dazu habe ich bereits während meiner Diplomarbeit gemacht. Der I_0 -Einstrom erreichte bei pH_e 9 seine größte Amplitude, nahm bei pH_e 7,5 und pH_e 6 ab und erst bei pH_e 4 wieder zu (Abb. 3.2.2). Zudem war I_S wesentlich schwächer von der äußeren Protonenkonzentration abhängig als bei ChR2-WT. Zwischen pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4 nahm der stationäre Strom nur um das 3-fache zu. Verglichen mit dem Wildtyp ist das eine viel schwächere pH_e-

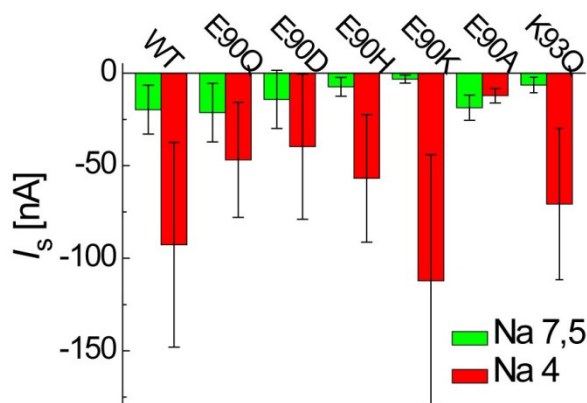


Abb. 3.2.1 Durchschnittliche stationäre Photoströme der E90 Mutanten und K93Q. I_s bei pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4/ -100 mV.

Abhängigkeit des Einstroms. Zwischen pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 6 gab es bei E90Q sogar eine leichte Abnahme des stationären Stroms.

In NMG-Cl war der Einstrom stärker vom pH_e -Wert abhängig. Der Anfangsstrom nahm zwischen pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4 um das 10-fache zu und erreicht damit fast die Zuwachsrate vom Wildtyp. Beim stationären Strom entsprach die 18-fache Zunahme etwas mehr als der Hälfte des Wertes von Chr2-WT.

Auffälligstes Merkmal von E90Q war der deutliche Ausstrom von Ladungsträgern

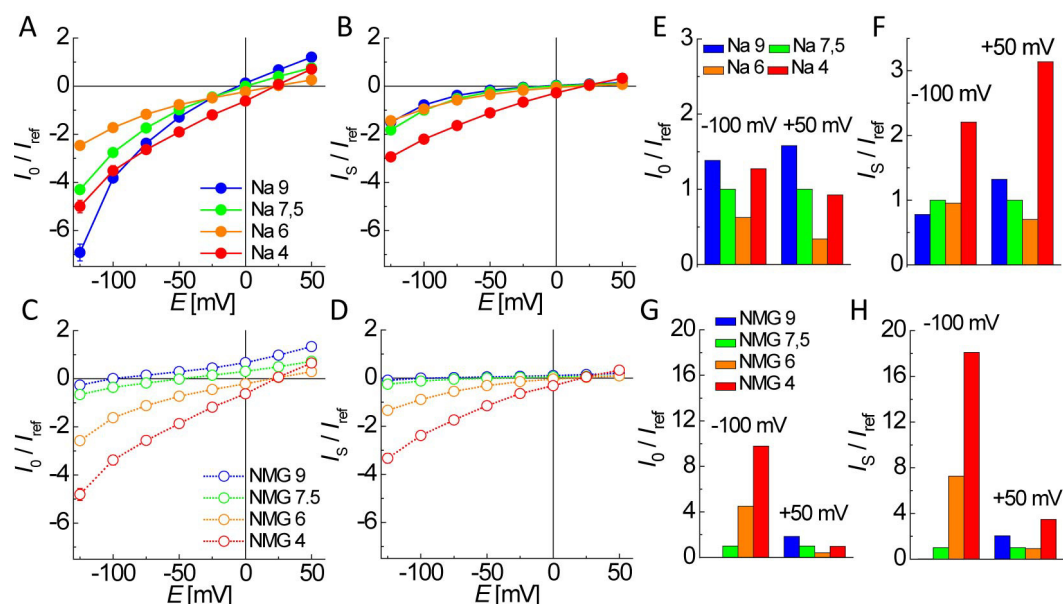


Abb. 3.2.2 E90Q Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten **A** I_0 und **(B)** I_s in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). **C** I_0 und **(D)** I_s in NMG-Cl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e pH_e 7,5/ -100 mV normiert (I_{ref}). Es gibt eine starke Überschneidung der I_0 Kurven in NaCl und einen deutlichen Ausstrom bei pH_e 4/ +50 mV. **E** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_s) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Bei I_0 nahm der Einstrom zwischen pH_e 9 und 6 ab. Den größten Einstrom gab es bei pH_e 9. Bei I_s gab es den größten Ausstrom bei pH_e 4. **G** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_s) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Hier gab es eine stetige Zunahme des I_0 Einstroms bei sinkendem pH_e .

bei pH_e 4 / + 50 mV. Dieses Phänomen trat bei ChR2-WT nicht auf. Der Ausstrom hatte bei pH_e 6 sein Minimum und nahm bei pH_e 4 wieder zu. In der stationären Phase war er bei pH_e 4 sogar viermal größer als bei pH_e 9.

Die Amplituden des Ausstroms wurden durch die Abwesenheit von extrazellulären Natriumionen kaum beeinflusst, während der Einstrom unter neutralen und basischen Bedingungen deutlich abnahm. In NMG-Cl sank der stationäre Strom bei pH_e 7,5 / -100 mV auf 13 % gegenüber NaCl. Bei pH_e 6 reduzierte sich I_S nur auf 93 %, was eine deutlich geringere Abnahme als bei ChR2-WT war (Abb. 3.2.3 C).

E90Q Umkehrpotentiale

Mit Na^+ im Außenmedium lagen die Umkehrpotentiale bei allen pH -Werten wesentlicher näher bei 0 mV als bei ChR2-WT (Abb. 3.2.3-A). Zum Beispiel waren sie in der stationären Phase bei pH_e 7,5 und pH_e 9 mit jeweils -3 mV und -9 mV signifikant positiv verschoben. Dagegen waren die Umkehrpotentiale bei pH_e 6 und pH_e 4 mit jeweils +18 mV und +22 mV deutlich negativer im Vergleich zum Wildtyp. Die Verschiebung des Umkehrpotentials zwischen pH_e 6 und pH_e 4 war äußerst gering, während gleichzeitig die Amplituden des Einstroms und des Ausstroms zunahmen. Ohne Na^+ im Außenmedium blieben die Umkehrpotentiale unter sauren Bedingungen unverändert. Bei pH_e 7,5 und 9 waren sie dagegen deutlich negativer als bei ChR2-WT. Das könnte auf einen stärkeren Kaliumausstrom hinweisen. Die Differenz zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_S fiel bei Na_e / pH_e 9 mit 3,5 mV deutlich geringer aus als beim Wildtyp (Abb. 3.2.3-B).

Die schwache pH_e -Abhängigkeit der Stromamplituden und der Umkehrpotentiale sind ein klares Indiz für eine reduzierte Protonenleitfähigkeit von E90Q. Eine detaillierte Diskussion dazu findet in Kap. 4.2.5 statt.

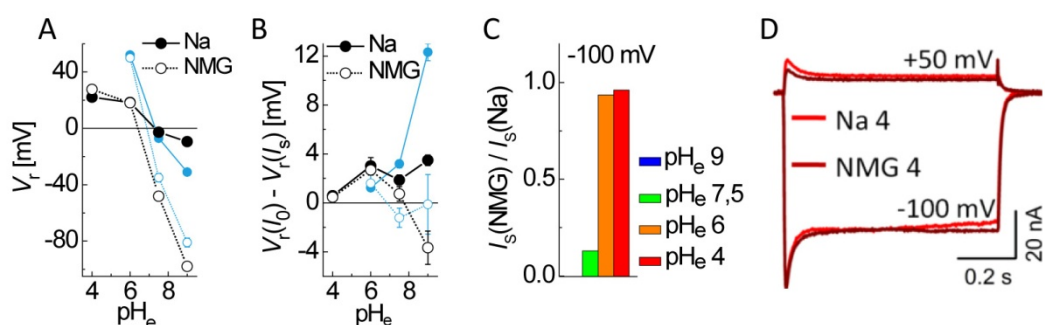


Abb. 3.2.3 Umkehrpotentiale von E90Q und Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl. **A** V_r des stationären Stroms in NaCl und NMG-Cl bei vier pH_e -Werten. Es gab nur eine relativ schwache Verschiebung von V_r zwischen pH_e 9 und pH_e 4. **B** Differenzen zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_S . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ negativer als $V_r(I_S)$. Die E90Q Werte (schwarz) wurden mit ChR2-WT (blau) verglichen. **C** Verhältnis von I_S in NMG-Cl zu I_S in NaCl bei -100 mV. Der Anteil von Protonen am Einstrom nahm bei pH_e 6 sprunghaft zu und war dort bereits relativ hoch. **D** E90Q Photoströme bei pH_e 4 in NaCl und NMG-Cl bei -100 mV und +50 mV. Der hier zu sehende Ausstrom bei +50 mV trat nicht bei ChR2-WT auf.

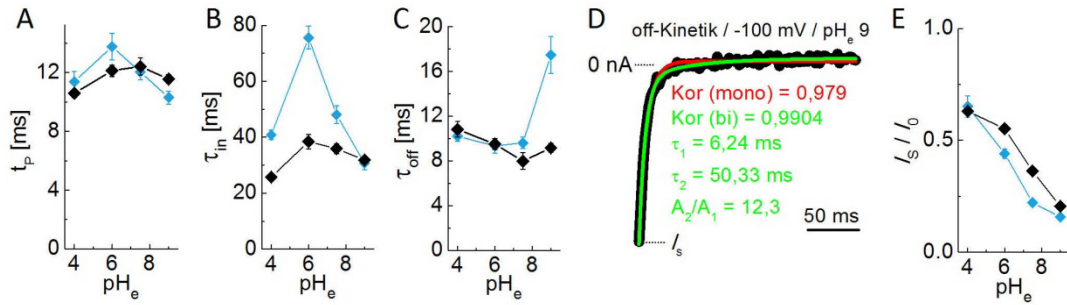


Abb. 3.2.4 E90Q Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Alle Daten beziehen sich auf -100 mV und wurden mit den Wildtypwerten verglichen (blau) **A** Dauer vom Anregungsbeginn bis zum Erreichen des transienten Stroms (I_p). **B** τ -Werte der Inaktivierung und (**C**) des *off*-Stroms bei monoexponentieller Anpassung. **D** *Off*-Kinetik des Photostroms (schwarz) bei pH_e 9/ -100 mV. Im Vergleich zu ChR2-WT lieferten monoexponentielle Funktionen (rot) eine relativ gute Korrelation (Kor). Im biexponentiellen Fit war der Anteil der langsamen Komponente (A_2) kleiner. **E** Verhältnis von I_0 zu I_s .

E90Q Kinetiken

Die τ -Werte der E90Q Kinetiken bei Anregung mit Lichtpulsen waren denen von ChR2-WT sehr ähnlich (Abb. 3.2.4). Hier traten aber der Einfluss des pH_e -Wertes sowie der biexponentielle Charakter der Stromspuren nicht so deutlich hervor. Zum Beispiel waren die Verlangsamung der Inaktivierung (τ_{in}) und der *on*-Kinetik (t_p) bei pH_e 6 weniger stark ausgeprägt. Ein weiterer Unterschied betraf die *off*-Kinetik bei pH_e 9, die vergleichsweise schnell war, weil die langsame Komponente hier nur einen geringen Anteil ($A_2/A_1 = 0,12$) und einen kleinen τ -Wert hatte ($\tau_2 = 50,3$ ms). Die Beschleunigung der E90Q Kinetiken unter physiologischen Bedingungen zeigte sich auch an der Inaktivierung, deren τ -Wert mit 36 ms etwa 12 ms kleiner im Vergleich mit dem Wildtyp war. Ebenso war die *Recovery* Kinetik mit einem τ -Wert von 6,6 s bei pH_e 7,5/ -75 mV gegenüber ChR2-WT signifikant beschleunigt (Abb. 3.2.5-C).

Die Kanalöffnung nach Laserblitzaktivierung war unter Referenzbedingungen (Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV) fast doppelt so schnell wie die des Wildtyps (Abb. 3.2.5). Das Intervall bis zum Erreichen des transienten Stroms dauerte 1,2 ms. Der τ -Wert der *off*-Kinetik war unter diesen Bedingungen ca. 2 ms kleiner und lag bei 7,6 ms.

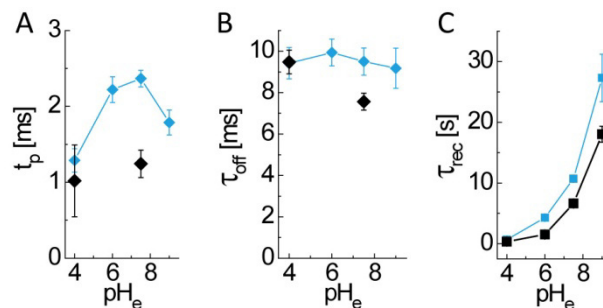


Abb. 3.2.5 E90Q Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und *Recovery* Kinetik im Doppelpulsexperiment. E90Q (schwarz) im Vergleich mit ChR2-WT (blau). **A** Dauer vom Laserblitz bis zum Erreichen des Maximalstroms (I_p) bei -100 mV. Die Kanalöffnung war bei pH_e 7,5 schneller als beim Wildtyp. **B** τ -Werte des *off*-Stroms bei -100 mV. **C** τ -Werte der *Recovery* Kinetik bei -75 mV. Die Erholung des transienten Stroms war etwas langsamer als bei ChR2-WT, beschleunigte sich aber ebenfalls bei sinkendem pH_e .

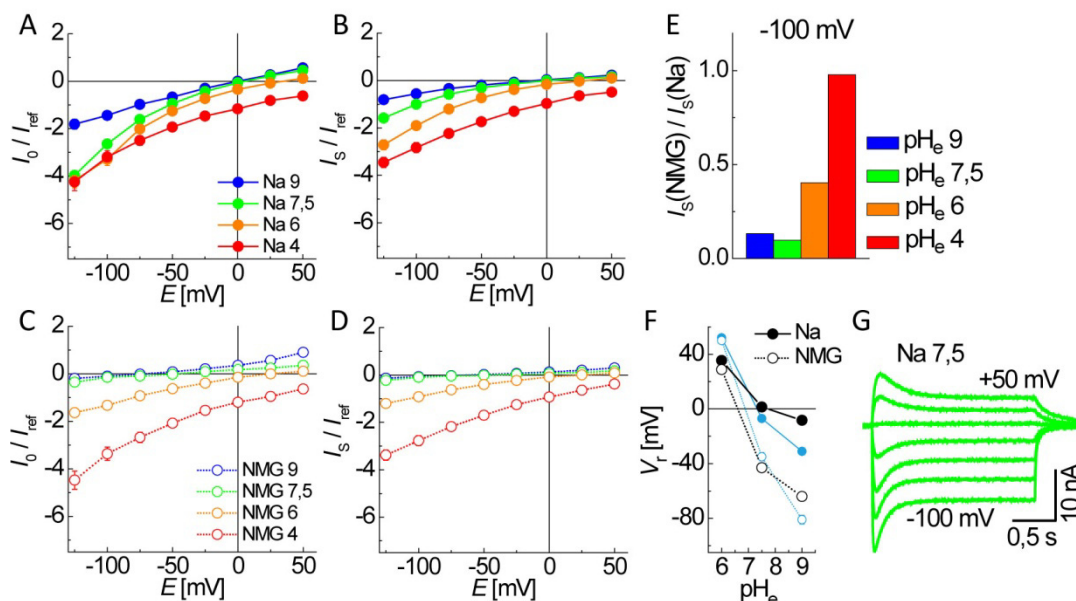


Abb. 3.2.6 E90D Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten **A** I_0 und **(B)** I_S Amplituden in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). **C** I_0 und **(D)** I_S Amplituden in NMG-Cl. Alle gemessenen Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV normiert (I_{ref}). **E** Verhältnis von I_S in NMG-Cl zu I_S in NaCl bei -100 mV. **F** Umkehrpotentiale von I_S in NaCl und NMG-Cl im Vergleich zu WT (blau). **G** Photoströme bei Anregung mit Lichtpulsen, bei pH_e 7,5 in NaCl, zwischen -100 mV und +50 mV.

3.2.2 E90D

Wie bei ChR2-WT war der Einstrom sowohl in der Anfangs- als auch in der stationären Phase nur schwach vom pH_e -Wert abhängig (Abb. 3.2.6). Hierbei fiel auf, dass die deutlichste Zunahme des Einstroms beim Wechsel von pH_e 9 auf pH_e 7,5 stattfand. Außerdem sank der stationäre Strom bei pH_e 9/ -100 mV auf 13%, nachdem die Natriumionen aus dem Außenmedium entfernt wurden (Abb. 3.2.6-E). Damit war der Reduktion des Einstroms unter basischen Bedingungen nicht nur schwächer als beim Wildtyp, sondern auch schwächer als bei pH_e 7,5. Der Einstrom in NMG-Cl muss aber nicht zwangsläufig nur von Protonen stammen. Möglicherweise werden von E90D bei NMG $_e$ / pH_e 9/ -100 mV verstärkt bivalente Kationen in die Zelle transportiert.

E90D Umkehrpotentiale

Die schwache pH-Abhängigkeit spiegelte sich auch in den Umkehrpotentialen wieder. Gegenüber dem Wildtyp gab es unter basischen und neutralen Bedingungen deutliche positive Verschiebungen auf jeweils $V_r = -8$ mV und $V_r = +1$ mV für den stationären Strom (Abb. 3.2.6-F). Bei pH_e 6 lag das Umkehrpotential bei ca. 35 mV und war damit 17 mV negativer als beim Wildtyp. Der Einfluss von Protonen auf das Umkehrpotential war bei E90D also schwächer. Die Differenz zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_S bei Na_e/pH_e 9 war mit $\Delta E = 8$ mV um ca. 4 mV kleiner als beim Wildtyp.

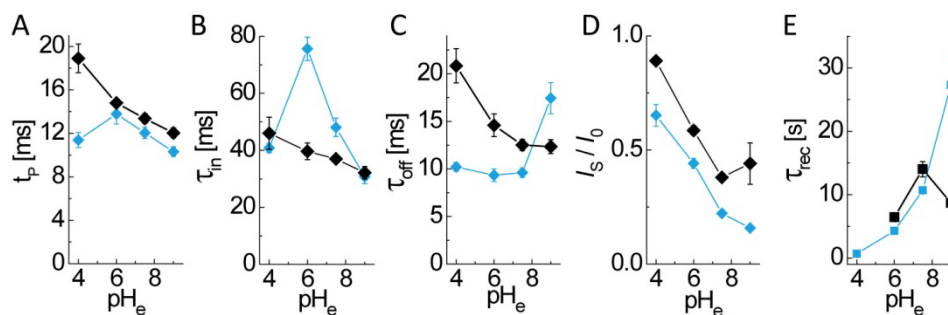


Abb. 3.2.7 pH_e -Abhängigkeit der E90D Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Alle Daten, außer der Recovery Kinetik beziehen sich auf -100 mV und wurden mit den Wildtypwerten verglichen (blau) **A** Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_p . **B** τ -Werte der Inaktivierung und **(C)** des off-Stroms bei monoexponentieller Anpassung. **D** Verhältnis von I_0 zu I_s . **E** τ -Werte der Recovery Kinetik bei -75 mV.

E90D Kinetiken

Wegen zu kleiner Photoströme konnte ich die Kinetiken nach Blitzlichtanregung unter physiologischen Bedingungen nicht auslesen. Es lassen sich aber einige Rückschlüsse aus der Anregung mit Lichtpulsen ziehen (Abb. 3.2.7). Zunächst konnten sämtliche τ -Werte durch monoexponentielle Fits ermittelt werden. Bei pH_e 7,5/ -100 mV gab es gegenüber dem Wildtyp eine leichte Verlangsamung der *on*-Kinetik ($t_p = 13,4$ ms) und der *off*-Kinetik ($\tau_{off} = 12,5$ ms), aber auch eine deutliche Beschleunigung der Inaktivierung mit einem τ -Wert von 37 ms. Die *Recovery* Kinetik war mit $\tau_{rec} = 14$ s bei pH_e 7,5/ -75 mV langsamer als die des Wildtyps.

3.2.3 E90H

Diese Mutante zeichnete sich vor allem durch ihre vergleichsweise kleinen Stromamplituden unter neutralen und basischen Bedingungen aus (Abb. 3.2.1). Dies wird begleitet von einer relativ schwachen Reduktion des Einstroms, nachdem die extrazellulären Natriumionen entfernt wurden (Abb. 3.2.9-A). Beispielsweise betrug bei NMG $_e$ / pH_e 7,5/ -100 mV der stationäre Einstrom noch 68% gegenüber der Amplitude in NaCl. Daher war in NMG-Cl der Anteil einströmender Natriumionen bereits gering, was auch die kleinen Photoströme von E90H unter Referenzbedingungen erklärt. Bei Na $_e$ / pH_e 9/ -100 mV war der Einstrom ebenfalls sehr klein und in NMG-Cl gab es hier einen Nettoausstrom. Die Strom/Spannungskurven von I_0 waren bei unterschiedlichen pH_e -Werten klar voneinander getrennt (Abb. 3.2.8). Die relative Zunahme des Einstroms war mit und ohne Na $^+$ im Außenmedium annähernd gleich. Zwischen pH_e 7,5 und pH_e 4/ -100 mV nahm die Stromamplitude um das 7-fache zu, wenn die Messlösung Na $^+$ enthielt. Demgegenüber stand eine 11-fache Steigerung in NMG-Cl.

E90H Umkehrpotentiale

Die Umkehrpotentiale waren in Anwesenheit von extrazellulärem Na $^+$ und unter neutralen und basischen Bedingungen deutlich negativer als beim Wildtyp und lagen bei jeweils -28 mV und -83 mV (Abb. 3.2.9). Die Differenz der Umkehrpotentiale zwischen NaCl und NMG-Cl fiel dabei geringer aus als beim

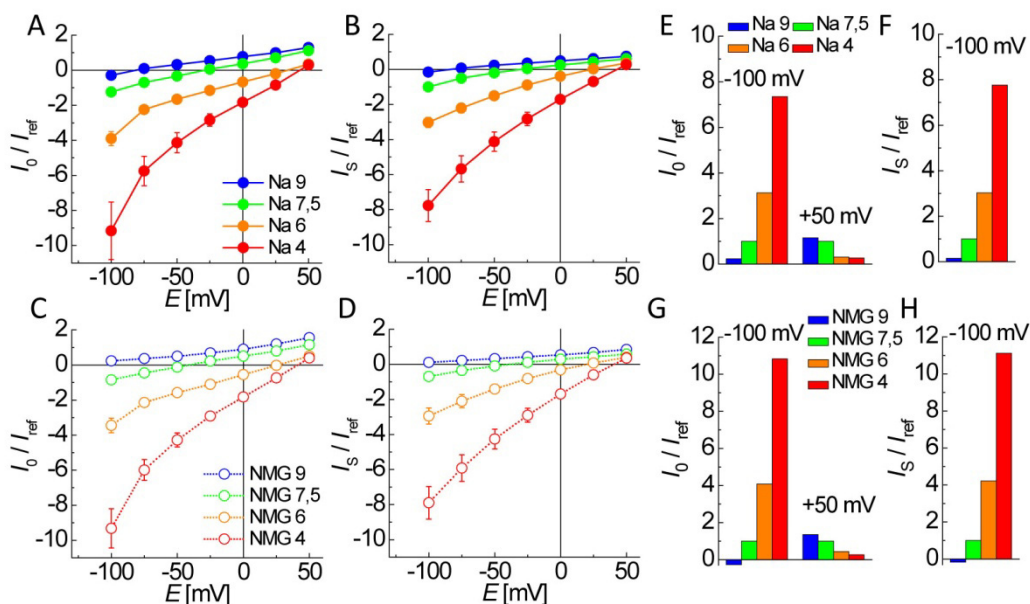


Abb. 3.2.8 E90H Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten **A** I_0 und **(B)** I_S Amplituden in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). **C** I_0 und **(D)** I_S Amplituden in NMG-Cl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e pH_e 7,5/ -100 mV normiert (I_{ref}). Alle Kurven sind deutlich voneinander getrennt, aber es gibt einen Ausstrom bei pH_e 4/ +50 mV. **E** pH_e Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_S) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Der I_0 Einstrom nahm mit sinkendem pH_e stetig zu. **G** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_S) in NMG-Cl. Normierung der Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5.

Wildtyp. Der Einfluss der extrazellulären Protonenkonzentration auf die Stromamplituden und Umkehrpotentiale weist eigentlich auf eine hohe Protonenselektivität von E90H hin. Dem stand das Verhalten dieser Mutante unter sauren Bedingungen gegenüber. So waren die Umkehrpotentiale mit jeweils +23 mV und +47 mV bei pH_e 6 und pH_e 4 deutlich positiver als beim Wildtyp und es konnte auch bei pH_e 4/ +50 mV ein klarer Nettoausstrom beobachtet werden.

E90H Kinetiken

Wegen der kleinen Stromamplituden konnten die Kinetiken der Photoströme bei pH_e 9/ -100 mV nicht ausgelesen werden. Bei E90H gab es im Gegensatz zu E90D eine stetige Beschleunigung der *on*- und *off*-Kinetik beim Übergang zu hohen extrazellulären Protonenkonzentrationen (Abb. 3.2.10-B+C). Demgegenüber stand ein relativ stabiler und hoher Anteil des stationären Stroms von 70% bis 80% bei allen pH_e -Werten. Die Inaktivierung reagierte ebenfalls nur schwach auf Veränderungen der Protonenkonzentration und war insgesamt schneller als bei Chr2-WT. Die *off*-Kinetik hatte einen eindeutig biexponentiellen Charakter, deren τ -Werte mit dem Wildtyp vergleichbar waren. Allerdings hatte die Amplitude der langsamen Komponente (A_2) einen höheren Anteil bei allen pH_e -Werten. Ich habe die *off*-Ströme auch mit monoexponentiellen Funktionen angepasst, um einen qualitativen Vergleich mit den anderen Mutanten zu ermöglichen. Unter

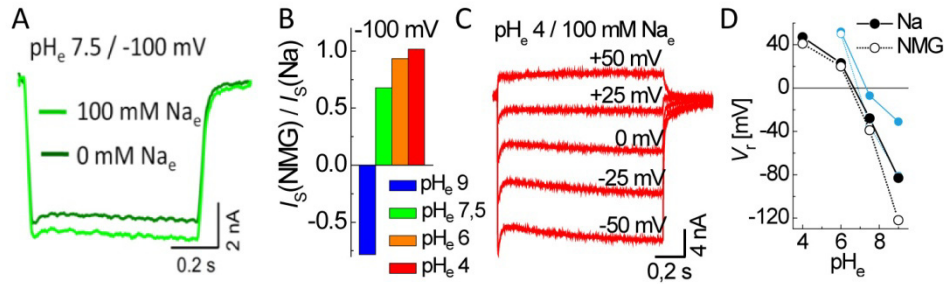


Abb. 3.2.9 Na^+ - und Protonenleitung von E90H. **A** Photoströme bei pH_e 7,5/ -100 mV in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ . Ohne Na^+ nahm der Einstrom kaum ab. **B** Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV. Bei pH_e 9 kam es zu einer Umkehrung der Stromrichtung: Ohne Na^+ außen strömten bei -100 mV Kationen aus der Zelle. **C** Photoströme bei Na_e / pH_e 4. Hier trat ein deutlicher Ausstrom bei +50 mV auf. **D** Umkehrpotentiale des stationären Stroms in NaCl und NMG-Cl (blau: ChR2-WT). Unter basischen und neutralen Bedingungen waren die Umkehrpotentiale deutlich negativer als beim Wildtyp und änderten sich relativ wenig in Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ . Unter sauren Bedingungen lag V_r relativ nahe bei 0 mV.

physiologischen Bedingungen gab es eine deutliche Verlangsamung der *on*- und der *off*-Kinetiken. Die Zeit zum Erreichen des transienten Stroms betrug ca. 17 ms, während der τ -Wert der monoexponentiellen *off*-Kinetik bei 17,5 ms lag. Der Übergang zum stationären Strom war dagegen deutlich schneller als beim Wildtyp und erreichte einen τ -Wert von ca. 30 ms.

Eine interessante Beobachtung betraf die Erholung des transienten Stroms. Wenn Zellen, die E90H exprimierten zum ersten Mal belichtet wurden, war der transiente Strom wesentlich größer ($I_s/I_p \sim 0,5$) als bei den darauf folgenden Anregungen (Abb. 3.2.11). Die I_p Amplitude der ersten Belichtung konnte aber selbst nach einer Dunkelphase von 10 min nicht wiederhergestellt werden. Dagegen bewirkte die Applikation von 570 nm oder 400 nm Licht zwischen zwei Anregungspulsen (500 nm), die teilweise Wiederherstellung des transienten Stroms. Im Gegensatz dazu konnte die *Recovery* Kinetik von ChR2-WT, durch die Applikation von Licht während der Dunkelphase nicht beschleunigt werden. Eine detaillierte Diskussion zu diesem Effekt findet in Kap. 4.2.5 statt.

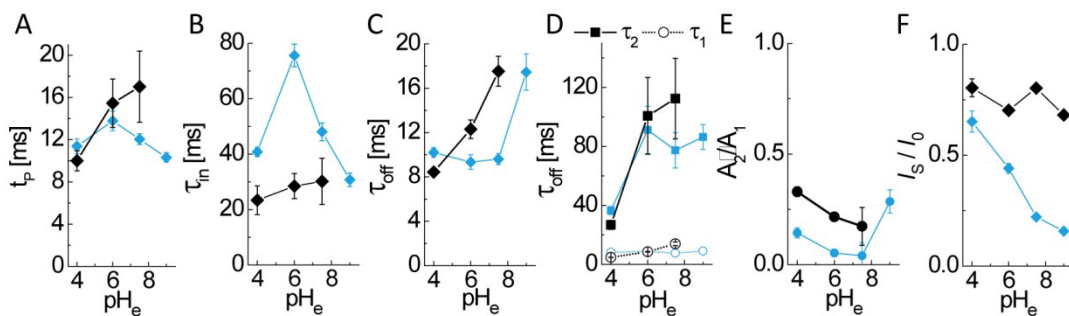


Abb. 3.2.10 pH_e -Abhängigkeit der E90H Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Die E90H Kinetiken (schwarz) stehen im Vergleich zu ChR2-WT (blau) **A** Länge des Intervalls vom Anregungsbeginn bis zum transienten Strom (I_p). **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen Fits. **C** τ -Werte der *off*-Kinetik bei monoexponentiellen und (**D**) biexponentiellen Fits sowie (**E**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **F** Verhältnis von I_s zu I_0 .

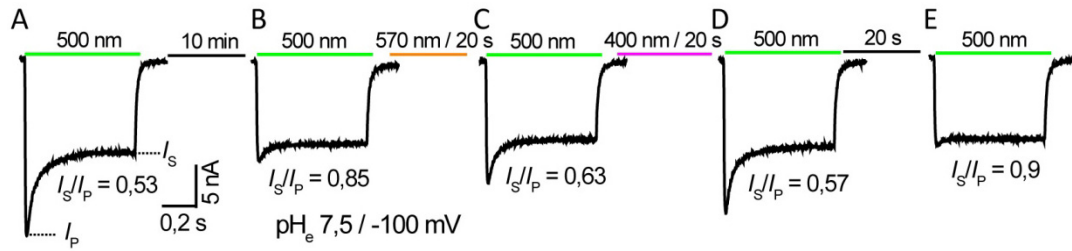


Abb. 3.2.11 Optisch induzierte Erholung des transienten Stroms von E90H. Die Photoströme wurden an derselben, vorher nicht belichteten Zelle gemessen und wurden in der Reihenfolge von links nach rechts unter Referenzbedingungen (pH_e 7,5 / -100 mV) aufgenommen. **A** Erste Aktivierung **B** Zweite Belichtung nach 10 min Dunkelphase. **C** Dritte Belichtung nach 20 s Applikation von 570 nm **D** Vierte Belichtung nach 20 s Applikation von 400 nm. **E** Fünfte Belichtung nach 20 s Dunkelphase. Im Dunklen erholte sich I_P nicht vollständig, konnte aber durch die Applizierung von 400 nm und 570 nm Licht teilweise wiederhergestellt werden.

3.2.4 E90K

Wie bei der Mutante E90H, waren auch nach Einführung einer weiteren basischen Aminosäure die Stromamplituden unter neutralen und basischen Bedingungen sehr klein (Abb. 3.2.1). Hier gab es ebenfalls nur eine schwache Reduktion des Einstroms, nachdem die Natriumionen aus dem Außenmedium entfernt wurden (Abb. 3.2.12-G). Das spricht ebenfalls für eine reduzierte Kationenleitfähigkeit von E90K. Im Gegensatz zu E90H beobachtete ich hier aber einen massiven Anstieg sowohl des Einstroms als auch des Ausstroms beim Übergang von pH_e 6 auf pH_e 4. Dies ist ein Indiz dafür, dass bei E90K die Kanalaktivität und Ionenselektivität vom pH_e -Wert abhängt. Für dieses Phänomen gibt aber es bisher keine eindeutige Erklärung und wird in Kap. 4.2.5 ausführlicher diskutiert.

3.2.5 E90A

Mit dieser Mutante wurde neben E90Q eine weitere ungeladene Aminosäure an Position 90 eingesetzt. Eine Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen findet sich auch in Sugiyama et al. [48]. Die Größe der Stromamplituden war unter neutralen Bedingungen vergleichbar mit denen von ChR2-WT (Abb. 3.2.1). Wie bei E90Q beobachtete ich aber nur eine schwache pH_e -Abhängigkeit der Stromamplituden und Umkehrpotentiale, wobei es eine leichte Reduktion des Einstroms in Richtung niedriger pH-Werte gab (Abb. 3.2.13). Dies galt sowohl für I_0 als auch für I_S . Außerdem strömten bei pH_e 4 / +50mV eindeutig Ladungsträger aus der Zelle. Daher gehe ich davon aus, dass bei E90A die Protonenleitfähigkeit abgenommen hat.

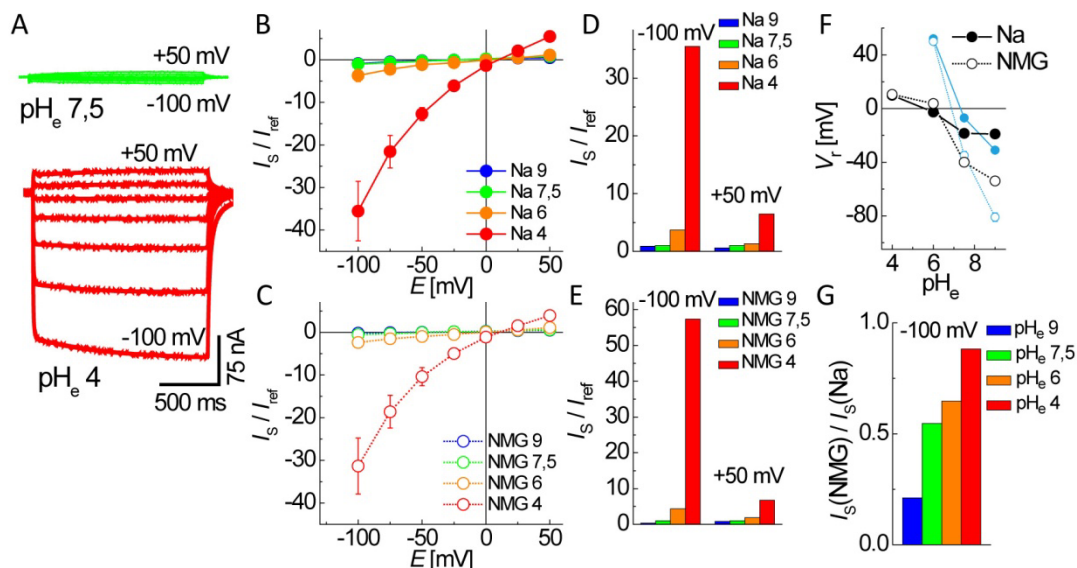


Abb. 3.2.12 Photoströme und Strom/Spannungskurven von E90K bei vier pH_e -Werten. **A** Stromspuren von *voltage clamp* Messungen zwischen -100 mV und +50 mV in NaCl bei pH_e 7,5 (grün) und pH_e 4 (rot). Die Amplituden bei pH_e 7,5 waren sehr klein, nahmen aber bei pH_e 4 sehr stark zu. Dort gab es bei +50 mV einen deutlichen Ausstrom. **B** I_s Amplituden in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). **C** I_s Amplituden in NMG-Cl. Alle Ströme wurden auf I_s bei Na_e pH_e 7,5/-100 mV normiert (I_{ref}). **D** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der stationären Phase (I_s) in NaCl und (**E**) NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Ein- und Ausströme nahmen bei sinkendem pH_e zu. **F** Umkehrpotentiale des stationären Stroms in NaCl und NMG-Cl (blau: WT). **G** Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV. Die Anteile von Protonen am Einstrom waren bei pH_e 9 und pH_e 7,5 größer als beim Wildtyp.

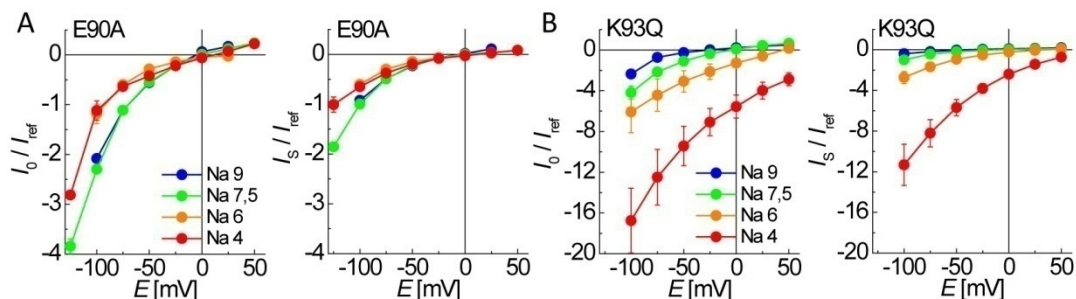


Abb. 3.2.13 Strom/Spannungskurven von E90A und K93Q. **A** I_0 (links) und I_s (rechts) Amplituden von E90A in NaCl bei vier pH_e -Werten (aufgenommen von Maila Reh). Bei pH_e 4/ +50 mV gab es einen Ausstrom. **B** K93Q unter den gleichen Bedingungen. Alle Amplituden wurden auf den Referenzwert der Messreihe normiert (I_s bei pH_e 7,5/-100 mV).

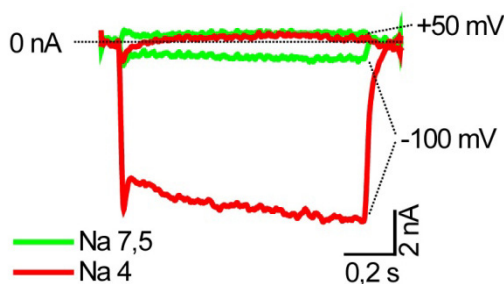


Abb. 3.2.14 E90L Photoströme bei pH_e 7,5 (grün) und pH_e 4 (rot), jeweils bei -100 mV und +50 mV. Die Amplituden waren bei pH_e 7,5 sehr klein, nahmen bei pH_e 4 aber verhältnismäßig stark zu. Dort gab es bei +50 mV einen Ausstrom in der stationären Phase.

3.2.6 E90L

Leucin ist ebenfalls unpolar, besitzt aber eine längere Alkylkette als Alanin, von der eine weitere Methylgruppe abzweigt. Mit Lichtpulsen konnte in mehreren Anläufen kein oder ein nur sehr schwacher Photostrom gemessen werden. Er betrug bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV in der Regel weniger als -0,5 nA. Bei einer einzelnen Messung gab es einen stationären Photostrom von -0,8 nA und ich habe bei pH_e 7,5 und pH_e 4 je eine Strom/Spannungskurve aufgenommen. Der stationäre Strom nahm bei pH_e 4/ -100 mV um das 8,7-fache zu, und es gab bei +50 mV einen kleinen Ausstrom (Abb. 3.2.14).

3.2.7 K93Q

Dieses Lysin befindet sich drei Positionen von E90 entfernt. Unter der Annahme, dass sich beide Aminosäuren in einer α -Helix befinden, könnten die beiden Seitengruppen übereinanderliegen und über Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrische Wechselwirkungen miteinander interagieren (Abb. 1.8).

Anders als bei den E90 Mutanten gab es hier eine klare Trennung der Stromamplituden bei -100 mV und keinen Nettoausstrom bei pH_e 4/ +50 mV (Abb. 3.2.13). Die Amplitude von I_0 nahm beim Übergang von basischen zu sauren Messlösungen stetig zu. Zwischen pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4 gab es einen 4-fachen Anstieg gegenüber dem Referenzwert. Beim stationären Strom nahm der Strom um das 11,3-fache zu. Auffällig war die Abnahme des Ausstroms bei +50 mV beim Übergang von pH_e 7,5 auf pH_e 9.

Ohne extrazelluläre Natriumionen habe ich nur eine Messung bei pH_e 7,5 vorgenommen, wobei der Einstrom bei -100 mV auf 9% des Ausgangswertes gegenüber NaCl abnahm. Dabei gab es eine Verschiebung des Umkehrpotentials von $V_r = -1,2$ mV (Na_e) auf $V_r = -40$ mV (NMG_e). Im Gegensatz zu E90Q oder E90H kam es bei K93Q also zu keiner massiven Reduktion der Protonen- oder Natriumleitfähigkeit.

3.2.8 Aktionsspektren von E90X und K93Q

Bei den Mutanten E90Q gab es keine erkennbaren Änderungen im Aktionsspektrum bei pH_e 7,5 (Abb 3.2.15). Bei K93Q kam es zu einer Anhebung im roten Bereich des Spektrums, was auch messtechnische Gründe haben kann. Das Maximum sowie die blaue Flanke des Spektrums blieben unverändert. Unter sauren Bedingungen gab es keine Veränderungen bei den Spektren von ChR2-WT und E90Q. E90K zeigte aber ein deutlich rotverschobenes Spektrum. Da die Aktivität dieser Mutante unter neutralen Bedingungen zu klein war, ist nicht klar, ob die Rotverschiebung durch den pH_e -Wert induziert wurde.

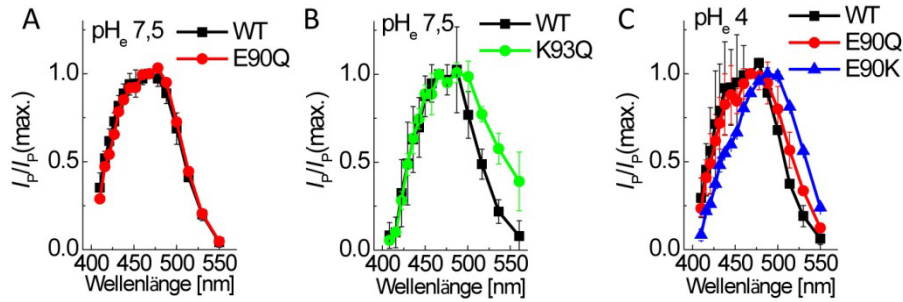


Abb. 3.2.15 Aktionsspektren von ChR2-WT, E90Q, E90H und K93Q. Die Konstrukte wurden mit Laserpulsen verschiedener Wellenlängen angeregt und die resultierenden I_P Ströme auf die höchste Aktivität normiert ($I_P(\text{max.})$). Die Spektren von ChR2-WT wurden an den jeweiligen Messtagen als Referenz zu den Mutanten immer wieder neu aufgenommen. **A** ChR2-WT, E90Q und **(B)** K93Q Spektren bei pH_e 7,5. **C** ChR2-WT, E90Q und E90H Spektren bei pH_e 4.

3.3 Charakterisierung von H134 Mutationen

Dieses Histidin nimmt in ChR2 die Position ein, an der in Bakteriorhodopsin (BR) Aspartat 96 sitzt (Abb. 1.8). Es ist dort ein entscheidender Teil der Protonenleitungskette und wirkt als der Protonendonator der Schiffbase. Entsprechend führen Mutationen an dieser Stelle zum Absinken der Pumpaktivität und zur Verlangsamung des Photozyklus von BR. Prinzipiell könnte H134 in ChR2 die gleichen Funktionen ausüben. In den ersten elektrophysiologischen Studien zu ChR2 konnte bereits gezeigt werden, dass die Mutation zu Arginin voll funktionsfähig ist und zum Anstieg der Photoströme unter neutralen pH Bedingungen führt [49,50]. Daher wird diese Variante auch als Alternative zu ChR2-WT in der Optogenetik eingesetzt [43]. Um die Funktion von H134 im ChR2 Mechanismus genauer zu untersuchen, habe ich diese Aminosäure zudem durch Aspartat, Asparagin, Serin und Phenylalanin ersetzt und elektrophysiologisch untersucht. Trotz des unterschiedlichen Charakters der eingesetzten Reste, waren sich diese Mutanten hinsichtlich ihrer Eigenschaften wesentlich ähnlicher als dies bei den E90 Mutationen der Fall war.

3.3.1 H134R

Ein wesentliches Merkmal von H134R war der große stationäre Strom, der im gesamten Messzeitraum durchschnittlich bei -26 nA unter Referenzbedingungen lag (Na 7,5/ -100 mV, Abb. 3.3.1). Die Anfangsströme waren wie beim Wildtyp nur schwach vom extrazellulären pH_e -Wert abhängig (Abb. 3.3.2). Allerdings gab es in NaCl ein eindeutiges Absinken des I_0 -Einstroms zwischen pH_e 9/ -100 mV und pH_e 6. Hier scheint eine steigende extrazelluläre Protonenkonzentration den Einstrom von Ladungsträgern in das Cytosol zu inhibieren. Erst bei pH_e 4/ -100 mV gab es wieder eine Zunahme auf das 1,5-fache des Ausgangswerts bei pH_e 7,5. Der stationäre Einstrom nahm mit steigender Protonenkonzentration zu, aber die Steigerung war mit einer 2,2-fachen Zunahme zwischen pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e

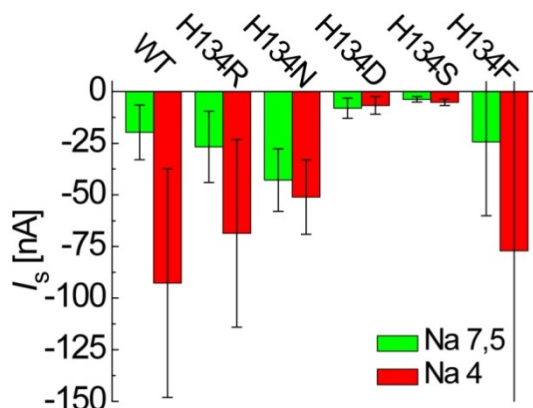


Abb.3.3.1 Durchschnittliche stationäre Photoströme der H134 Mutanten. I_s bei pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4/ -100 mV.

4 nur etwa halb so groß wie beim Wildtyp. In NMG-Cl fiel besonders die schwache pH_e -Abhängigkeit des stationären Stroms auf. Zwischen pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4 gab es eine 13-fache Zunahme der Amplitude, die damit nur wenig größer als die Steigerung des Anfangsstroms war.

Ohne Natriumionen im Außenmedium, sank I_s bei pH_e 7,5/ -100 mV auf ca. 18% gegenüber NaCl ab und war damit verhältnismäßig größer als bei ChR2-WT (Abb. 3.3.3-A). Der Anteil von Protonen am Einstrom war bei H134R offensichtlich größer.

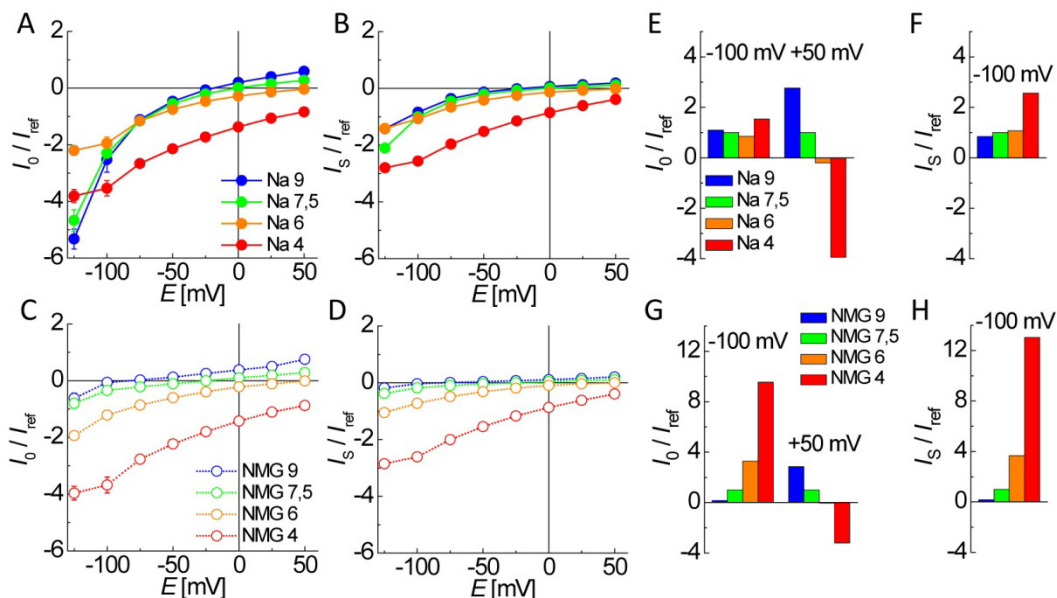


Abb. 3.3.2 H134R Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten. **A** I_0 und **(B)** I_s in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). Der Einstrom war bei pH_e 9/ -125 mV am größten. **C** I_0 und **(D)** I_s in NMG-Cl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e / pH_e 7,5/ -100 mV normiert. **E** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_s) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. **G** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_s) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert.

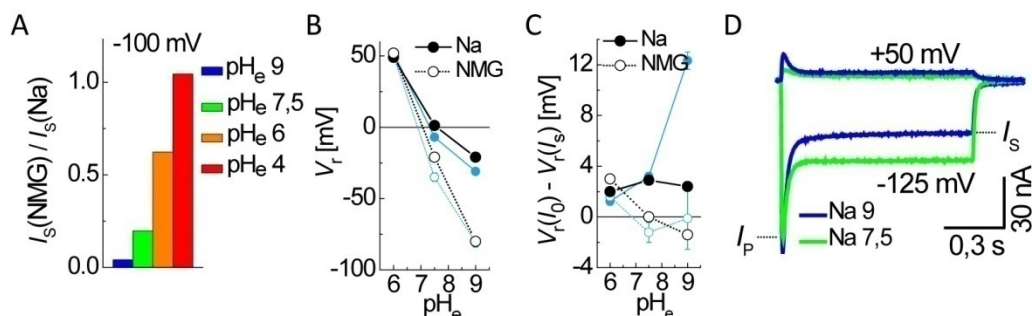


Abb. 3.3.3 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl sowie Umkehrpotentiale von H134R. **A** Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV. **B** V_r des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ bei drei pH_e -Werten **C** Differenzen zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_s . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ negativer als $V_r(I_s)$ (blau: Chr2-WT). **D** Photoströme in NaCl bei -125 mV und +50 mV. Trotz niedrigerer Protonenkonzentration war der I_P -Einstrom bei pH_e 9/-125 mV größer als bei pH_e 7,5.

H134R Umkehrpotentiale

Die Umkehrpotentiale der stationären Ströme lagen bei pH_e 7,5 und pH_e 9 jeweils bei $V_r = +1,4$ mV und $V_r = -21$ mV und waren damit gegenüber den jeweiligen Wildtypwerten signifikant positiv verschoben (Abb. 3.3.3). Allerdings gab es bei pH_e 9 nur einen Unterschied von 2,9 mV zwischen den Umkehrpotentialen von I_s und I_0 .

H134R Kinetiken

Die Öffnung und das Schließen des Kanals haben sich unter physiologischen Bedingungen verlangsamt, was man besonders gut nach der Laserblitzaktivierung erkennen konnte (Abb. 3.6.6). Der transiente Strom erreichte sein Maximum nach 3,3 ms und war damit etwa 1 ms langsamer als der des Wildtyps. Der τ -Wert der *off*-Kinetik war mit 17,6 ms um etwa 8,3 ms größer.

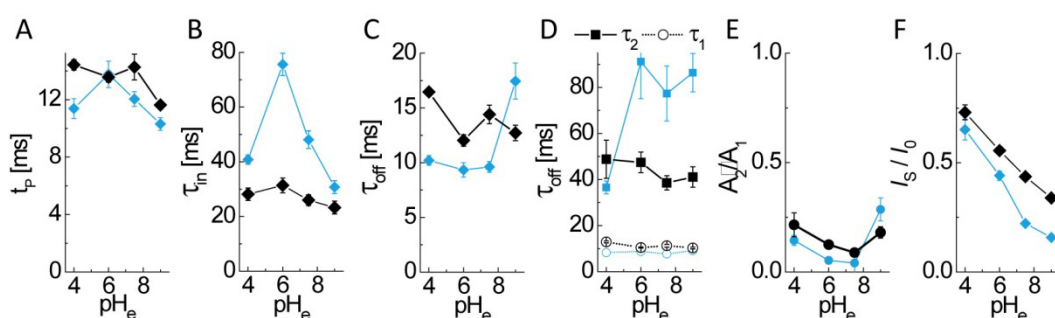


Abb. 3.3.4 pH_e -Abhängigkeit der H134R Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. H134R (schwarz) im Vergleich zu Chr2-WT (blau). **A** Dauer vom Anregungsbeginn bis zum Erreichen des transienten Stroms (I_P). **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen Fits. **C** τ -Werte der *off*-Kinetik bei monoexponentiellen und (**D**) biexponentiellen Fits sowie (**E**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. Obwohl die zweite Komponente schneller war als beim Wildtyp, schließt H134R langsamer als der Wildtyp, da die erste Komponente einen höheren τ -Wert hat. **F** Das Verhältnis von I_s zu I_0 war größer als bei Chr2-WT.

Bei einer Anregung mit Lichtpulsen war dagegen die Inaktivierung vergleichsweise schnell. Bei pH_e 7,5/ -100 mV lag der entsprechende τ -Wert bei 26 ms (Abb. 3.3.4). Das Verhältnis I_S/I_0 betrug jedoch 0,44 und war damit deutlich größer als beim Wildtyp. Die *off*-Kinetik war nach einer längeren Belichtung biexponentiell, wobei die langsamere, zweite Komponente mit einem τ -Wert von 38,6 ms nur halb so groß war wie beim Wildtyp. Trotzdem war die *off*-Kinetik von H134R verzögert, da die erste Komponente langsamer war ($\tau_1 = 11,3$ ms).

3.3.2 H134D

Durch diese Mutation befindet sich wie in BR eine Asparaginsäure an dieser Position. Hier fielen, besonders im Vergleich zu H134R, die kleinen Photoströme auf (Abb. 3.3.1). Des Weiteren gab es bei dieser Mutante ein besonders atypisches pH_e -abhängiges Verhalten. Zunächst verschoben sich die Umkehrpotentiale erwartungsgemäß mit sinkenden pH_e -Werten in Richtung positiver Werte. In NMG-Cl, kam es bei pH_e 9, 7,5 und 6 zu einer ähnlichen Reduktion des Einstroms wie bei Chr2-WT (Abb. 3.3.6-A). Die jeweiligen Stromamplituden bei -100 mV betrugen jeweils 2%, 12% und 66% der Werte in NaCl. Dabei kam es zu deutlichen negativen Verschiebungen der Umkehrpotentiale. Alles deutet darauf hin, dass diese Mutante Protonen leiten kann. Trotzdem nahm der Einstrom in NaCl bei zunehmender extrazellulärer Protonenkonzentration kontinuierlich ab (Abb. 3.3.5).

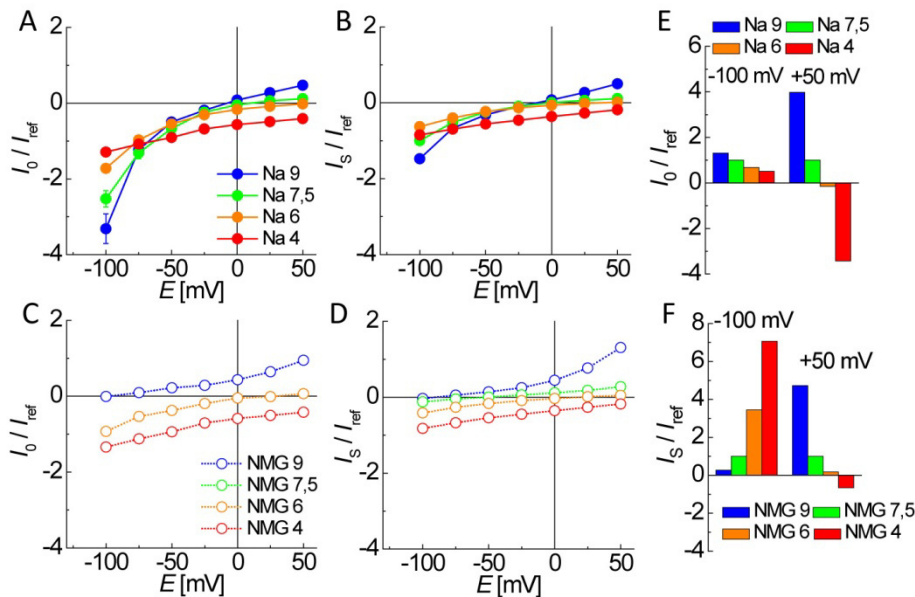


Abb. 3.3.5 H134D Strom/Spannungskurven bei vier pH_e Werten. **A** I_0 und **(B)** I_S in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). **C** I_0 und **(D)** I_S in NMG-Cl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV normiert. **E** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Mit Na^+ im Außenmedium gab es eine stetige Abnahme des I_0 Einstroms bei sinkendem pH_e . **F** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der stationären Phase (I_S) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Ohne Na^+ im Außenmedium gab es eine Zunahme des Einstroms bei sinkendem pH_e .

Dieses Phänomen beobachtete ich auch bei E90Q und H134R. Bei H134D war die Reduktion aber nicht nur auf den Anfangsstrom (I_0) beschränkt, sondern zeigte sich auch beim stationären Strom. Bei Na_e/pH_e 4/ -100 mV sank I_0 gegenüber pH_e 7,5 um die Hälfte ab. Beim stationären Strom beobachtete ich noch eine Reduktion auf 86%. Dagegen nahm der Ausstrom von Ladungsträgern mit zunehmenden Protonenkonzentrationen außen stetig ab. Letzteres entspricht zwar dem Verhalten eines protonenleitenden Kanals, aber es entstand insgesamt der Eindruck, dass die Aktivität von H134D durch Protonen inhibiert wurde (Abb. 3.3.6-B). Eine ausführlichere Diskussion findet in Kap. 4.2.1 statt.

H134D Kinetiken

Die Kanalkinetiken hatten sich gegenüber dem Wildtyp ebenfalls deutlich verändert. Zunächst beobachtete ich unter neutralen Bedingungen eine Beschleunigung der *on*-Kinetik und des Übergangs in die stationäre Phase (Abb. 3.3.7-A+B). Bei -100 mV erreichte der transiente Strom sein Maximum 11,1 ms nach Beginn der Lichtapplikation. Die Inaktivierung hatte einen τ -Wert von 24,7 ms. Dagegen hatten sich die schnelle ($\tau_1 = 23,1$ ms) und die langsame Komponente ($\tau_2 = 383$ ms) der *off*-Kinetik gegenüber dem Wildtyp deutlich verlangsamt (Abb. 3.3.7-C). Die Amplituden beider Komponenten waren bei pH_e 7,5 fast gleich groß. Das galt auch unter sauren Bedingungen, wohingegen bei pH_e 9 die langsame Komponente fast doppelt so groß war ($A_2/A_1 = 1,9$) und dadurch das Schließen des Kanals hier am längsten dauerte. Trotz der schnellen Inaktivierung war der Anteil des stationären Stroms vergleichsweise groß und unter physiologischen Bedingungen war $I_S/I_0 = 0,41$ (Abb. 3.3.7-E).

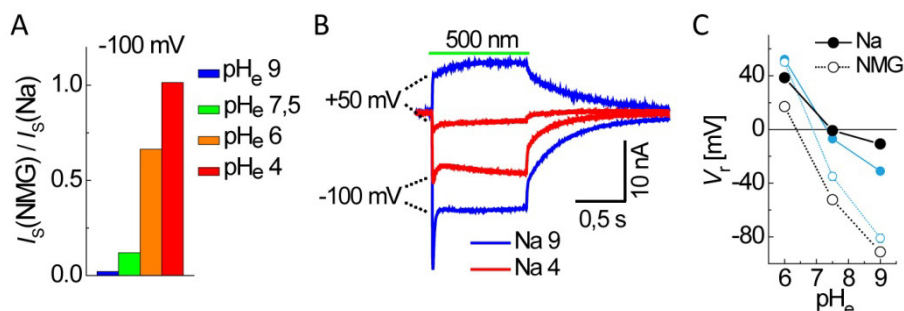


Abb. 3.3.6 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl und Umkehrpotentiale von H134D. **A** Verhältnis von I_S in NMG-Cl zu I_S in NaCl bei -100 mV. Der Anteil der Protonen am Einstrom nahm mit sinkendem pH_e zu und erreichte bei pH_e 4 100%. **B** Photoströme in NaCl. Trotz hoher Protonenkonzentration und einem hohen Anteil geleiteter Protonen war der Einstrom bei pH_e 4 (rot) geringer als bei pH_e 9 (blau). **C** V_r des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ bei drei pH_e -Werten. Es gab eine deutliche Verschiebung von V_r in Richtung positiver Werte bei sinkendem pH_e .

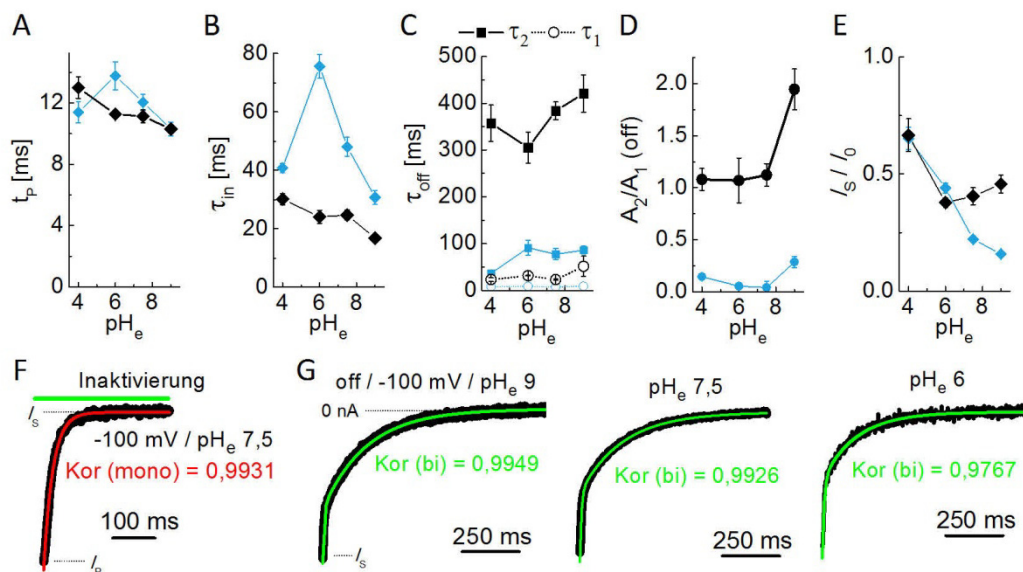


Abb. 3.3.7 pH_e-Abhängigkeit der H134D Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. (blau: ChR2-WT) **A** Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_p. Die on-Kinetik war ähnlich wie beim Wildtyp. **B** τ-Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen Fits. Die Inaktivierung hatte sich gegenüber ChR2-WT signifikant beschleunigt. **C** τ-Werte der off-Kinetik mit biexponentiellen Fits. Langsame und schnelle Komponente sind deutlich langsamer als beim Wildtyp. **D** Das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A₂) und schneller (A₁) Komponente bei biexponentiellen Fits ist deutlich größer als beim Wildtyp. **E** Verhältnis von I_s zu I₀. **F** Übergang des Photostroms (schwarz) von I_p zu I_s, bei pH_e 7,5/ -100 mV, mit monoexponentiellem Fit (rot) und Korrelationskoeffizienten (Kor) (grüner Balken: Lichtanregung). **G** off-Strom (schwarz) nach Ende der Lichtapplikation, mit biexponentiellen Fits, bei -100 mV, pH_e 9; 7,5 und 6. Durch den hohen Anteil der langsamen Komponente hatten die off-Kinetiken einen eindeutig biphasischen Verlauf. Das Schließen des Kanals war durch die extrem langsame zweite Komponente insgesamt sehr langsam.

3.3.3 H134N

Asparagin ist eine polare Aminosäure die ähnliche Wasserstoffbrückenbindungen wie Aspartat bilden kann, aber nicht in der Lage ist als Protonendonator oder -akzeptor zu fungieren. Im Durchschnitt war der stationäre Strom von H134N unter Referenzbedingungen mehr als doppelt so groß wie der des Wildtyps (Abb. 3.3.1). Mit -42,9 nA lag der Wert sogar etwa 16 nA über H134R. Der Einstrom war ausgesprochen schwach pH_e-abhängig, obwohl eine eindeutige Protonenleitfähigkeit vorlag. Zwischen pH_e 9 und pH_e 6 reduzierte sich die Amplitude des I₀ Stroms in Anwesenheit von Na⁺ um mehr als die Hälfte (Abb. 3.3.8). Beim Übergang zu pH_e 4 gab es wieder eine leichte Zunahme aber die Stromamplitude erreicht nur 70% des Referenzwertes bei pH_e 7,5/ -100 mV. Die pH_e-Abhängigkeit des stationären Einstroms zeigte eine ähnliche Tendenz, wobei die Steigerung bei pH_e 4 etwas stärker und I_s hier 20% größer als beim Referenzwert war. Der Ausstrom reduzierte sich mit zunehmender extrazellulärer Protonenkonzentration und ich beobachtete bei pH_e 4/ +50mV einen deutlichen Nettoeinstrom. In NMG-Cl nahm der Einstrom beim Übergang zu hohen Protonenkonzentrationen dagegen zu. Die 14-fache Steigerung der I_s Amplitude zwischen pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4 war aber vergleichsweise klein.

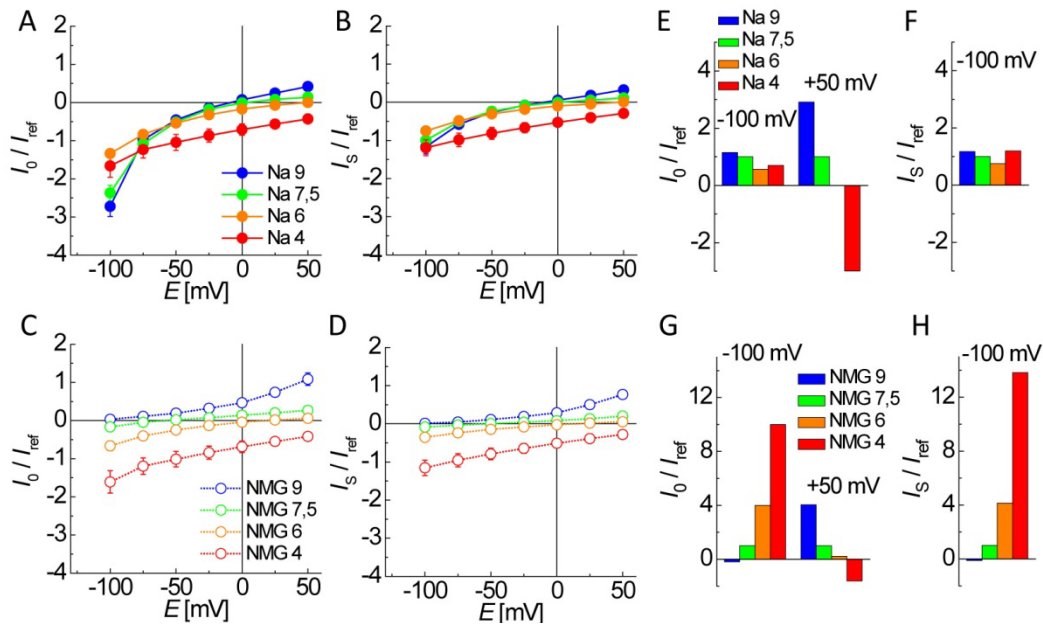


Abb. 3.3.8 H134N Strom/Spannungskurven bei vier pH_e-Werten. **A** I_0 und **(B)** I_S in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). **C** I_0 und **(D)** I_S Amplituden in NMG-Cl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e/ pH_e 7,5/ -100 mV normiert. **E** pH_e-Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_S) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Zwischen pH_e 9 und pH_e 6 nahm der Einstrom ab, während der Ausstrom bei sinkendem pH_e stetig abnahm. **G** pH_e-Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_S) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Ohne [Na⁺]_e nahm der Einstrom bei sinkendem pH_e eindeutig zu, während der Ausstrom stetig abnahm.

Ohne Natriumionen im Außenmedium, nahmen die Einstrome insbesondere unter basischen Bedingungen deutlich ab. Auch bei pH_e 7,5 war die Reduktion des stationären Stroms auf 8,6% gegenüber NaCl signifikant stärker als beim Wildtyp (Abb. 3.3.9-A).

H134N Umkehrpotentiale

Wie bei H134D waren die Umkehrpotentiale von H134N, in NaCl in Richtung 0 mV verschoben. In NMG-Cl lagen die Umkehrpotentiale des stationären Stroms bei

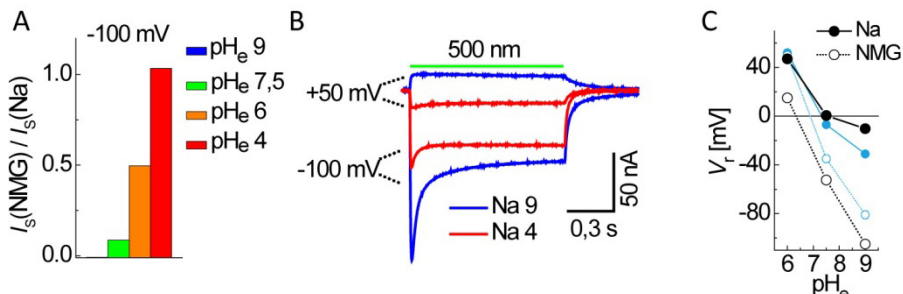


Abb. 3.3.9 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl und Umkehrpotentiale von H134N. **A** Verhältnis von I_S in NMG-Cl zu I_S in NaCl bei -100 mV. Der Anteil von Protonen am Einstrom nahm bei sinkendem pH_e eindeutig zu. **B** Photoströme in NaCl. Trotz hoher Protonenkonzentration und einem hohen Anteil geleiteter Protonen war der Einstrom bei pH_e 4 (rot) geringer als bei pH_e 9 (blau). **C** V_r des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na⁺ bei drei pH_e-Werten. V_r verschob sich mit zunehmender Protonenkonzentration in Richtung positiver Werte.

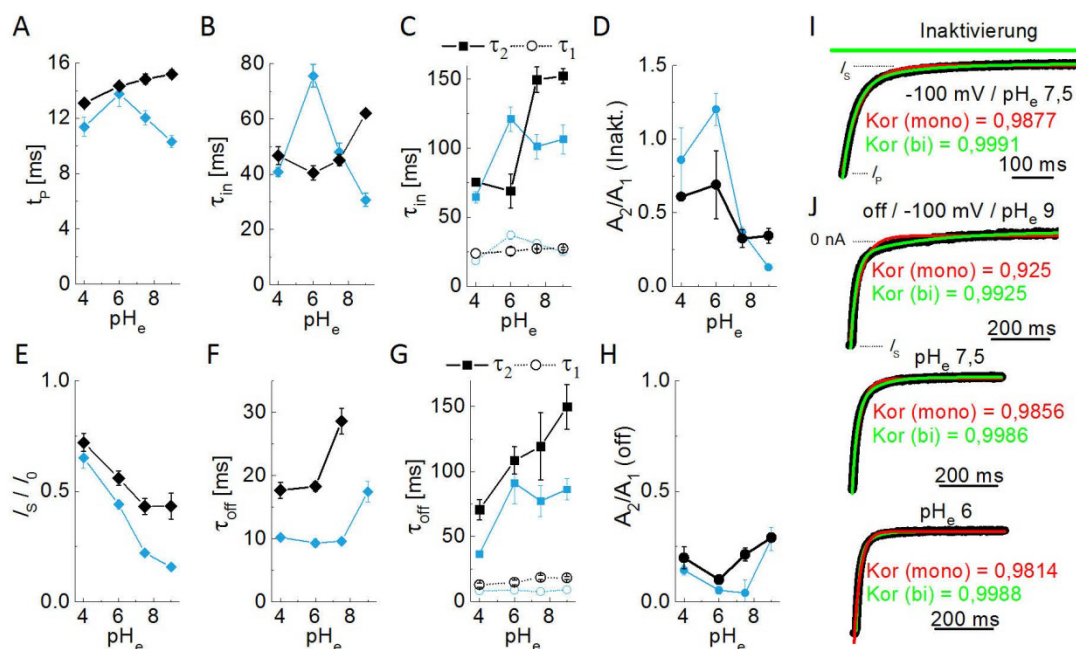


Abb. 3.3.10 pH_e -Abhängigkeit der H134N Kinetiken bei Anregung mit Lichtpulsen. (blau: ChR2-WT) **A** Länge des Intervalls bis zum transienten Strom (I_p). **B** τ -Werte der Inaktivierung mit monoexponentiellen und (**C**) biexponentiellen Fits sowie (**D**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **E** Verhältnis von I_s zu I_0 . **F** τ -Werte der *off*-Kinetik mit monoexponentiellen und (**G**) biexponentiellen Fits sowie (**H**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. Das Schließen des Kanals war gegenüber ChR2-WT signifikant langsamer. Die τ -Werte der beiden Komponenten waren größer und die langsame Komponente hatte bei allen pH_e -Werten einen höheren Anteil. **I** Übergang des Photostroms (schwarz) von I_p zu I_s , bei pH_e 7,5/ -100 mV, mit mono- (rot) und biexponentiellem (grün) Fit und deren Korrelationskoeffizienten (Kor) (grüner Balken: Lichtaktivierung). **J** *off*-Strom (schwarz) nach Ende der Lichtapplikation, mit mono- und biexponentiellen Fits, pH_e 9; 7,5 und 6.

pH_e 9 und pH_e 7,5 jeweils bei $V_r = -105$ mV und $V_r = -52$ mV und waren damit gegenüber ChR2-WT negativ verschoben. Beides spricht für einen höheren Anteil ausströmender Kaliumionen bei H134N.

H134N Kinetiken

Die großen Stromamplituden von H134N erlaubten eine Analyse der Photostromkinetiken nach Laserblitzaktivierung (Abb. 3.1.11-B+C). Hier zeigte sich, dass unter neutralen Bedingungen sowohl die Kanalöffnung, als auch das Schließen des Kanals deutlich langsamer waren als beim Wildtyp. Die Zeit zum Erreichen des transienten Stroms (t_p) betrug bei -100 mV ca. 3,3 ms. Der τ -Wert der *off*-Kinetik war mit 24 ms annähernd dreimal so groß, wie der von ChR2-WT. Dies bestätigte sich durch die Anregung mit Lichtpulsen (Abb. 3.3.10). Die Zeit bis zum Erreichen des transienten Stroms betrug hier 14,8 ms. Die *off*-Kinetik war gegenüber der Laserblitzanregung deutlich verzögert, da hier eine langsamere zweite Komponente ($\tau_2 = 119$ ms) mit einem Anteil von 21% auftrat. Die Inaktivierung hatte einen τ -Wert von 45 ms und war damit etwa so schnell wie die des Wildtyps. Unter neutralen Bedingungen war das Verhältnis I_s/I_0 trotzdem größer und lag bei 0,43. Eine ausführlichere Diskussion dazu findet in Kap. 4.2.1 statt.

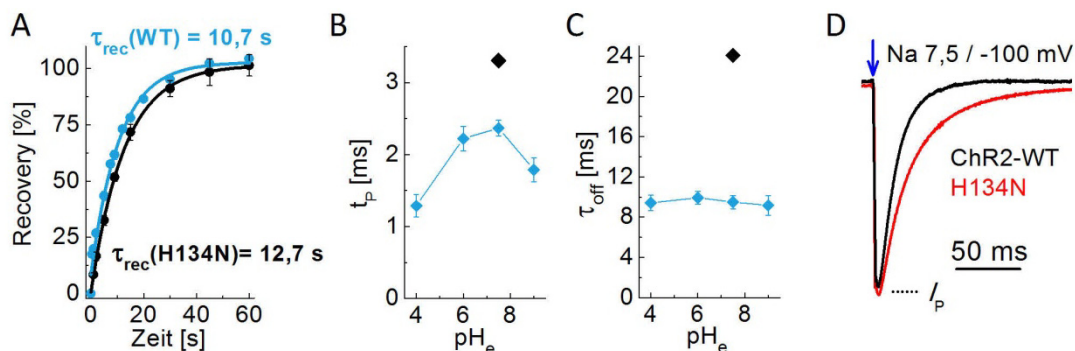


Abb. 3.3.11 H134N Recovery Kinetik und Laserblitzaktivierung bei pH_e 7,5. **A** H134N (schwarz) und ChR2-WT (blau) Recovery Kinetik im Doppelpulsexperiment, bei pH_e 7,5/ -75 mV. Die Erholung des transienten Stroms war bei H134N etwas langsamer als beim Wildtyp. **B** Intervalllänge von Laserblitz bis zu I_p . **C** τ -Wert der off-Kinetik. **D** H134N Photostrom (rot) nach Blitzlichtaktivierung (Pfeil) im Vergleich zu ChR2-WT (schwarz), bei -100 mV in NaCl. Öffnung und Schließvorgang waren bei H134N gegenüber dem Wildtyp verzögert.

3.3.4 H134S

Die Einführung von Serin an Position 134 geht auf einen Vorschlag von Prof. Suneel Kateriya zurück, der diese Aminosäure in einem bislang unbekannten Channelrhodopsin identifiziert hat. Wie in H134N befand sich durch die Einführung eines Serins eine weitere polare, nicht geladene Aminosäure an dieser Position. Die pH-Abhängigkeiten des Ein- und Ausstroms waren ähnlich, aber die

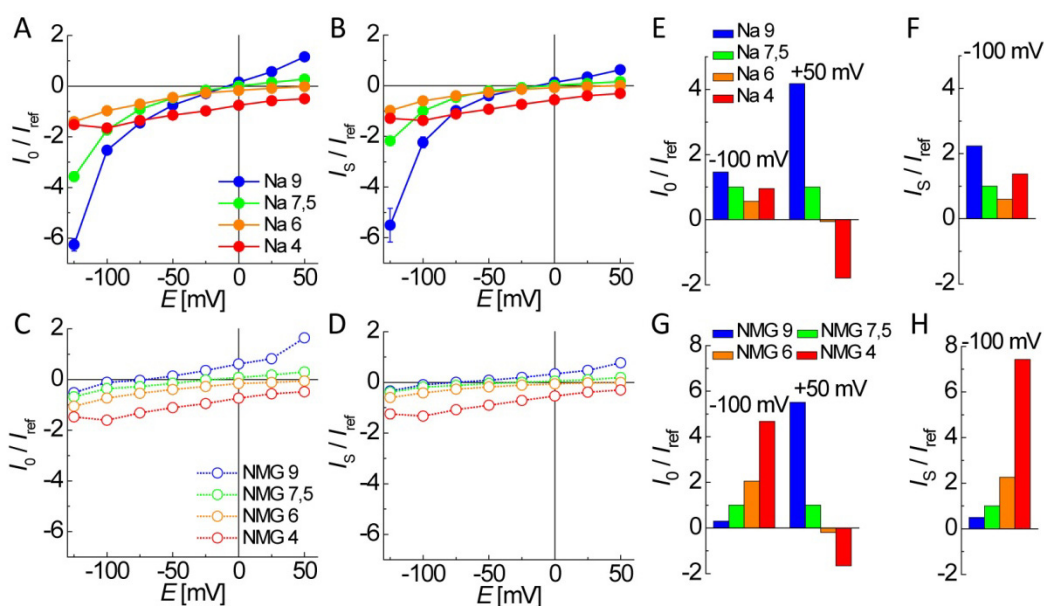


Abb. 3.3.12 H134S Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten. **A** I_0 und **(B)** I_S Amplituden in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). **C** I_0 und **(D)** I_S in NMG-Cl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e pH_e 7,5/ -100 mV normiert. **E** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_S) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Mit Na^+ im Außenmedium war der I_0 und I_S Einstrom bei niedrigen Protonenkonzentrationen am größten. Der Ausstrom nahm mit sinkendem pH_e stetig ab. **G** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_S) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Der Einstrom nahm mit sinkendem pH_e stetig zu.

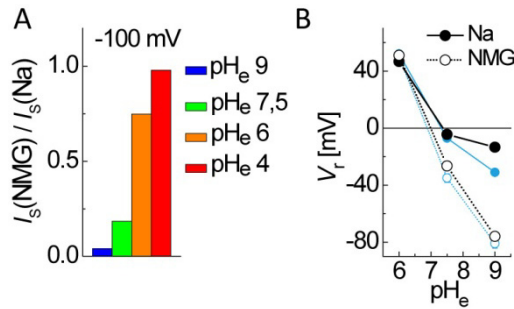


Abb. 3.3.13 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl und Umkehrpotentiale von H134S. A Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV. **B** V_r des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ bei drei pH_e -Werten.

Stromamplituden signifikant kleiner. Unter Referenzbedingungen betrug der stationäre Strom nur ca. 3,8 nA und war damit durchschnittlich 2,9 nA kleiner als der von H134D (Abb. 3.3.1). Der Einstrom von Ladungsträgern erreichte sein Maximum unter basischen Bedingungen und nahm beim Übergang zu pH_e 6 ab. Dies galt sowohl für I_0 als auch für I_s (Abb. 3.3.12). Bei pH_e 4 gab wieder es eine signifikante Zunahme und die Photoströme betrugen hier jeweils 96% und 137% des Referenzwertes. Der Ausstrom erreichte ebenfalls bei pH_e 9 sein Maximum. Er reduzierte sich stetig in Richtung zunehmender extrazellulärer Protonenkonzentration. Des Weiteren gab es eine signifikante Verschiebung der Umkehrpotentiale von $V_r = -13$ mV (Na 9) auf $V_r = +47$ mV (Na 6), was für die Protonenleitfähigkeit von H134S spricht (Abb. 3.3.13-B). In Medien mit NMG-Cl lagen die Umkehrpotentiale unter basischen und neutralen Bedingungen bei jeweils -76 mV und -26 mV. Bei pH_e 6 gab es keine signifikante Verschiebung des Umkehrpotentials nach Entfernung der Natriumionen, aber der stationäre Strom bei -100 mV sank auf 75% des Ausgangswertes (Abb. 3.3.13-A). Bei H134S nahm der Anteil von Protonen am Einstrom mit sinkendem pH_e -Wert zu, aber dadurch wurde offensichtlich der Einstrom anderer Ladungsträger inhibiert. Eine ausführliche Diskussion dazu findet in Kap. 4.2.1 statt.

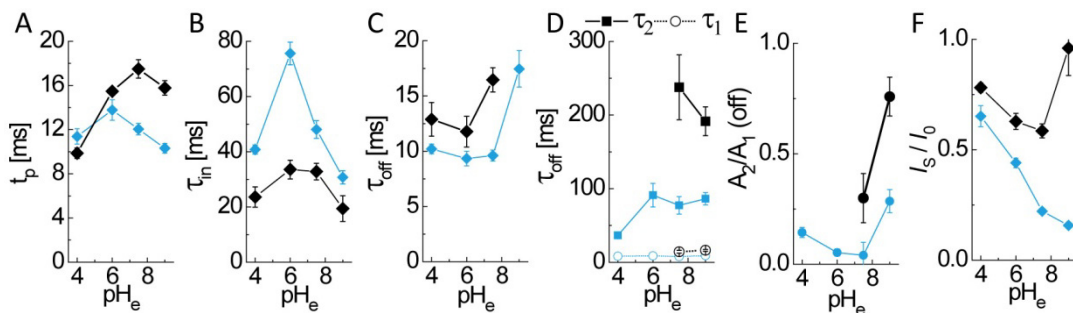


Abb. 3.3.14 pH_e -Abhängigkeit der H134S Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Die H134S Werte (schwarz) stehen im Vergleich zu ChR2-WT (blau). **A** Dauer vom Anregungsbeginn bis zum transienten Strom (t_p). **B** τ -Werte der Inaktivierung mit monoexponentiellen Fits. **C** τ -Werte der off-Kinetik mit monoexponentiellen und **(D)** biexponentiellen Fits sowie **(E)** das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **F** Verhältnis von I_s zu I_0 .

H134S Kinetiken

H134S zeigte im Vergleich zu ChR2-WT langsamere Kanalkinetiken. Wegen der kleinen Stromamplituden konnte ich aber nur aus den Anregungen mit Lichtpulsen verwertbare Daten gewinnen (Abb. 3.3.14). Unter Referenzbedingungen erreichte der transiente Strom bei -100 mV nach 17,5 ms sein Maximum (Abb. 3.3.14-A). Die *off*-Kinetik war biexponentiell und hatte eine sehr langsame zweite Komponente ($\tau_1 = 14,4$ ms; $\tau_2 = 30$ ms) deren Anteil bei etwa 30% lag. Die Inaktivierung war monoexponentiell und hatte einen τ -Wert von 32,8 ms, der signifikant kleiner war als der entsprechende Wert von ChR2-WT. Das Verhältnis von I_S zu I_0 war dennoch vergleichsweise hoch und betrug 0,59 bei pH_e 7,5.

3.3.5 H134F

Für die letzte Substitution an Position 134 habe ich Phenylalanin ausgewählt, da sich diese Aminosäure in Sensory Rhodopsin II (SRII) an gleicher Stelle befindet. Dadurch wird in SRII die Reprotonierung der Schiffbase von cytosolischer Seite verzögert und damit die Lebenszeit des M-Intermediats verlängert [51]. ChR2-H134F wurde weniger intensiv untersucht, da ich vor allem nach Änderungen in der Kinetik der Photoströme unter physiologischen Bedingungen gesucht habe.

Die Amplitude des stationären Stroms lag mit 24,3 nA im Bereich des Wildtyps. Der Einstrom war in der Anfangs- und in der stationären Phase bei Na_e/ pH_e 4/ -100 mV jeweils 1,6-mal und 3,2-mal größer als der Referenzwert bei pH_e 7,5 (Abb. 3.3.15-A+B). Wobei es hier sowohl bei I_0 als auch bei I_S eine Abnahme zwischen pH_e 9 und pH_e 6 gab. In dieser Hinsicht ähnelt H134F den anderen H134 Mutanten. Die Umkehrpotentiale verschoben sich mit zunehmender Protonenkonzentration zu positiveren Werten. Bei pH_e 6 war $V_r = +39$ mV und im Vergleich zum Wildtyp etwas negativer, lag aber unter neutralen und basischen Bedingungen mit jeweils -33 mV und -9 mV nahe bei den Wildtypwerten. Wie bei den anderen H134 Mutanten, gab es auch hier keine deutliche Differenz zwischen den Umkehrpotentialen von I_S und I_0 .

Bei Anregung mit Lichtpulsen und unter Referenzbedingungen waren die Kanalkinetiken denen des Wildtyps sehr ähnlich (Abb. 3.3.15-C+D). Das Intervall bis zum Erreichen des transienten Stroms hatte eine Länge von 11 ms. Die *off*-Kinetik hatte einen τ -Wert von 11,6 ms. Die Inaktivierung war mit einem τ -Wert von 27 ms mehr als 20 ms schneller als die des Wildtyps. Dabei lag das Verhältnis von I_S zu I_0 bei 0,41 und war damit vergleichsweise hoch.

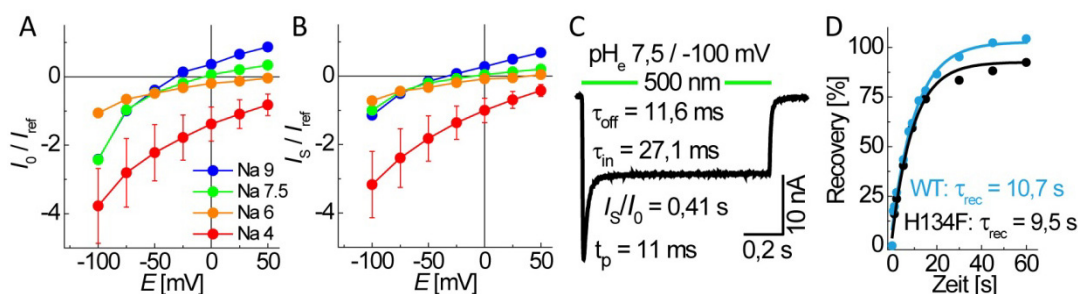


Abb. 3.3.15 H134F Strom/Spannungskurven und Photostromkinetiken. **A** I_0 und **(B)** I_S Amplituden in NaCl nach Normierung auf I_S bei pH_e 7,5/ -100 mV. **C** Stromspur unter kontinuierlicher Anregung (500 nm) mit Angabe der Kanalkinetiken (t_p : Intervalllänge vom Anregungsbeginn zu I_p , I_S/I_0 : Verhältnis von I_S zu I_0 , τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, τ_{off} : τ Wert der *off*-Kinetik). Gegenüber den Wildtypkinetiken kam es zu keiner dramatischen Verlangsamung der Kanalkinetiken. **D** Recovery Kinetik bei pH_e 7,5 im Vergleich mit ChR2-WT.

3.4 Charakterisierung von E123 Mutationen

Glutamat 123 befindet sich in ChR2 an der Position, an der in Bakteriorhodopsin Aspartat 85 sitzt (Abb. 1.8). Dieser Rest spielt eine essentielle Rolle in der Protonenleitungskette und bei der Aktivierung von BR als primärer Protonenakzeptor der Schiffbase. Mutationen an dieser Stelle können zur Verlangsamung des Photozyklus und zum Absinken der Pumpaktivität führen [52]. Da wir aus den spektroskopischen Messungen wissen, dass die Schiffbase vor der Kanalöffnung deprotoniert wird, könnte E123 als potentieller Protonenakzeptor eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von ChR2 spielen. Des Weiteren sollten die Mutationsstudien klären, ob E123 an der Porenbildung und Ionenleitung beteiligt ist.

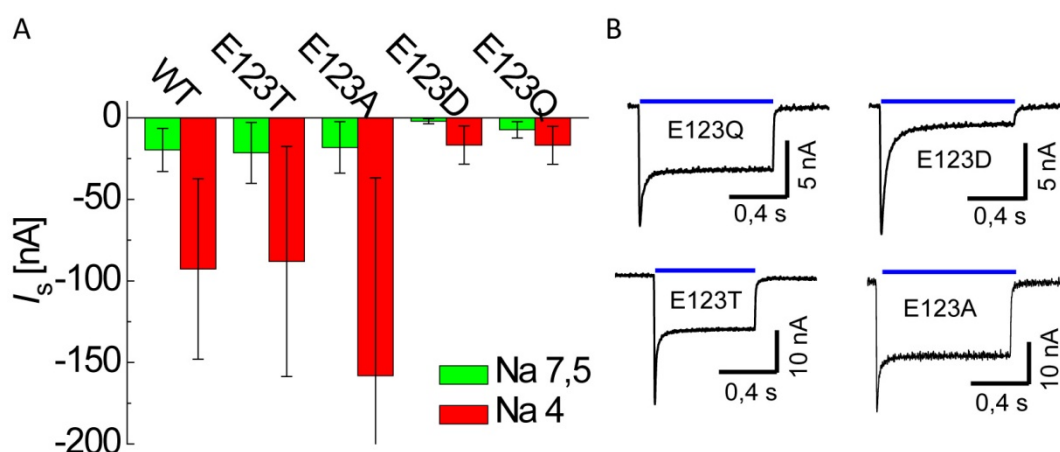


Abb. 3.4.1 Durchschnittliche stationäre Photoströme der E123 Mutanten. **A** I_S bei pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4/ -100 mV. **B** Photoströme bei Anregung mit Lichtpulsen (450 nm) unter Referenzbedingungen (Na 7,5/ -100 mV).

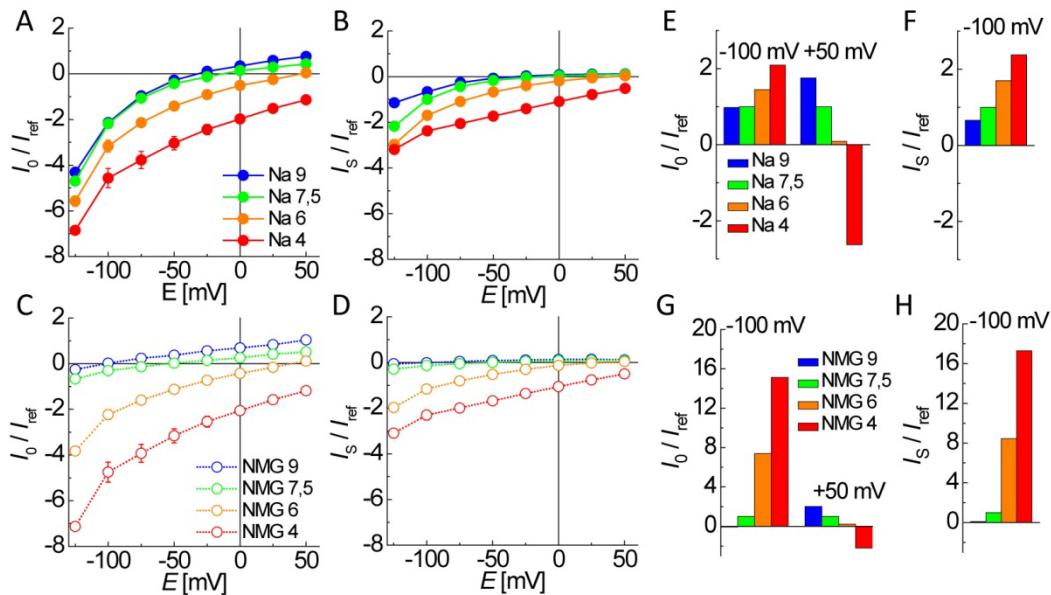


Abb. 3.4.2 E123Q Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten. **A** I_0 und **(B)** I_S in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). Die I - V -Kurven sind deutlich voneinander getrennt. **C** I_0 und **(D)** I_S Amplituden in NMG-Cl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV normiert. **E** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_S) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. **G** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_S) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert

3.4.1 E123Q

In der ersten elektrophysiologischen Studie zu Chr2, wurde diese Mutante unter physiologischen Bedingungen bereits qualitativ untersucht. Dort fiel sie durch deutlich reduzierte Photoströme auf [1]. Dieses Ergebnis konnte ich hier bestätigen, da die stationäre Stromamplitude im Durchschnitt nur -7,4 nA betrug (Abb. 3.4.1). Im Gegensatz zu den H134 Mutanten überschneiden sich die Strom/Spannungskurven von E123Q nicht (Abb. 3.4.2). In NaCl nahm I_0 zwischen pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4 um das 2,1-fache zu. Damit war die pH_e -Abhängigkeit von I_0 stärker als beim Wildtyp, wohingegen die des stationären Stroms mit einer 2,4-fachen Steigerung schwächer ausfiel. Dieses Resultat bestätigte sich bei Messungen in NMG-Cl. Zwischen pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4 betrug die relative Zunahme des Einstroms das 15,1-fache für I_0 , während die I_S Amplitude um das 17,3-fache anstieg.

Ohne Natriumionen im Außenmedium, nahm der Einstrom bei pH_e 9, pH_e 7,5 und pH_e 6 ab. Die Reduktion der Photoströme wurde mit zunehmender äußerer Protonenkonzentration geringer. Bei NMG $_e$ / pH_e 9/ -100 mV sank die I_S Amplitude auf 2% gegenüber dem Ausgangswert in NaCl. Bei pH_e 7,5 und pH_e 6 lagen die Anteile bei jeweils 13% und 70% (Abb. 3.4.3-A). Die Anteile von Protonen am Einstrom lagen etwa auf dem Niveau des Wildtyps. Da die Einstrome aber eindeutig mit sinkenden pH_e -Werten zunahmen, muss deren inhibitorische Wirkung bei E123Q schwächer sein. Eine detaillierte Diskussion zur Ionenselektivität von E123Q findet in Kap. 4.2.2 statt.

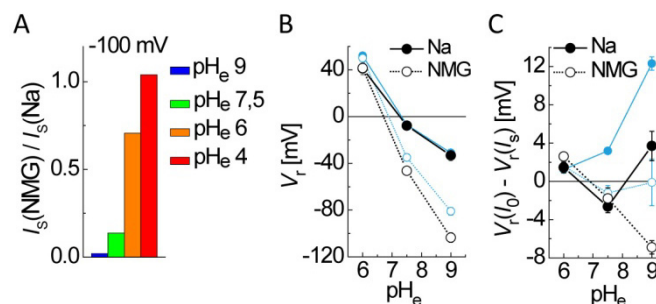


Abb. 3.4.3 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG und Umkehrpotentiale von E123Q. **A** Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV. Der Anteil von Protonen am Einstrom nahm bei sinkendem pH_e stetig zu. **B** V_r des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ bei drei pH_e -Werten. **C** Differenzen zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_s . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ negativer als $V_r(I_s)$ (blau: Wildtyp).

E123Q Umkehrpotentiale

Unter neutralen und basischen Bedingungen waren die I_s Umkehrpotentiale in NaCl mit denen des Wildtyps fast identisch (Abb. 3.4.3-B). Nur bei pH_e 6 gab es eine signifikante, negative Verschiebung auf $V_r = +41$ mV. Bei Na_e/pH_e 9 lagen die Umkehrpotentiale von I_0 und I_s nur 3,7 mV auseinander. Auffällig war aber eine Differenz von $\Delta E = -6,9$ mV bei NMG_e/pH_e 9. In NMG-Cl waren die Umkehrpotentiale von E123Q gegenüber Chr2-WT negativ verschoben. Ihre Werte betrugen für I_s bei pH_e 9, pH_e 7,5 und pH_e 6 jeweils -104 mV, -46 mV und +41 mV.

E123Q Kinetiken

Die Kanalkinetiken haben sich in E123Q gegenüber Chr2-WT teilweise drastisch geändert. Sie waren zum einen schneller und zum anderen nur schwach von der Membranspannung abhängig. Nach Laserblitzaktivierung waren die Intervalle zum transienten Strom (t_p) teilweise so schnell, dass sie nicht von den, durch die Kanalöffnung ausgelösten kapazitiven Strömen unterschieden und ausgelesen werden konnten (Abb. 3.4.4). Bei pH_e 7,5/-100 mV betrug dessen Länge nur 0,6 ms. Die *off*-Kinetik hatte einen τ -Wert von 4,8 ms und blieb zwischen -125 mV und

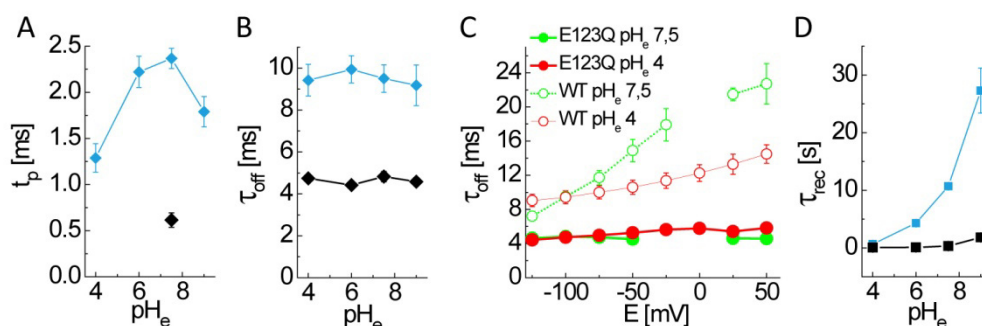


Abb. 3.4.4 E123Q Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und Recovery Kinetik im Doppelpulsexperiment **A** Dauer vom Laserblitz bis I_p und **(B)** τ -Werte der *off*-Kinetik bei -100 mV. Kanalöffnung und das Schließen des Kanals waren gegenüber Chr2-WT (blau) signifikant beschleunigt. **C** Spannungsabhängigkeit der *off*-Kinetik von E123Q im Vergleich zum Wildtyp. Das Schließen von E123Q verlangsamte sich nicht in Richtung positiver Spannungen. **D** τ -Werte der *Recovery* Kinetik bei -75 mV im Vergleich zu Chr2-WT (blau). Die *Recovery* Kinetik war bei allen pH_e -Werten signifikant beschleunigt.

+50 mV stabil. Dieses Phänomen trat auch bei pH_e 4 auf, wobei sich die Geschwindigkeit mit der der Kanal schließt bei -100 mV kaum verändert hat ($\tau_{\text{off}} = 4,6$ ms).

Bei Anregung mit Lichtpulsen waren die Kanalkinetiken gegenüber dem Wildtyp ebenfalls deutlich beschleunigt (Abb. 3.4.5). Das Intervall bis zum Erreichen des transienten Stroms dauerte 9,6 ms unter Referenzbedingungen (pH_e 7,5/ -100 mV). Die *off*-Kinetik war bei pH_e 7,5 nur schwach biexponentiell, wobei das Verhältnis zwischen der schnellen ($\tau_1 = 5,6$ ms) und der langsamen Komponente ($\tau_2 = 46,8$ ms) bei $A_2/A_1 = 0,08$ lag. Der Anteil von A_2 stieg bei pH_e 9/ -100 mV auf 25% und ihr τ -Wert war deutlich größer ($\tau_2 = 160$ ms). Die *off*-Kinetik blieb, wie nach der Anregung mit Laserblitzen relativ unabhängig vom pH_e -Wert. Die Inaktivierungskinetik konnte bei allen pH_e -Werten monoexponentiell gefittet werden. Der Übergang zum stationären Strom beschleunigte sich mit zunehmender Protonenkonzentration im Außenmedium. Das Verhältnis von I_S zu I_0 war bei pH_e 7,5/ -100 mV ca. 0,46. Der Quotient nahm mit steigender Protonenkonzentration zu und erreicht bei pH_e 6 mit $I_S/I_0 = 0,54$ ein Maximum, stieg bei pH_e 4 aber nicht weiter an.

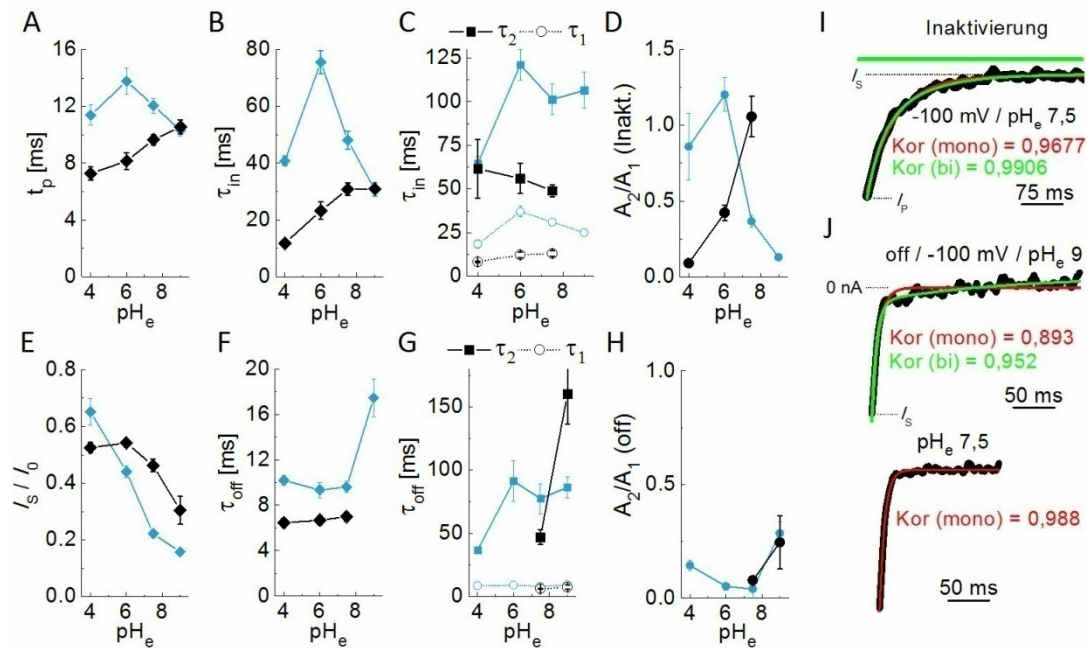


Abb. 3.4.5 E123Q Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Die meisten Kanalkinetiken waren gegenüber Chr2-WT (blau) signifikant beschleunigt. **A** Länge des Intervalls bis zum transienten Strom (I_p). **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen und (**C**) biexponentiellen Fits sowie (**D**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **E** Das Verhältnis von I_S zu I_0 war relativ hoch, stieg bei pH_e 4 aber nicht weiter an. **F** τ -Werte der *off*-Kinetik bei monoexponentiellen und (**G**) biexponentiellen Fits sowie (**H**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **I** Übergang des Photostroms (schwarz) von I_p zu I_S , bei pH_e 7,5/ -100 mV, mit mono- (rot) und biexponentiellem (grün) Fit und deren Korrelationskoeffizienten (Kor) (grüner Balken: Lichtapplikation). **J** *off*-Strom (schwarz) nach Ende der Lichtapplikation, mit mono- und biexponentiellen Fits, bei -100 mV, pH_e 9 und pH_e 7,5.

Außerdem gab es eine signifikante Beschleunigung der *Recovery* Kinetik (Abb. 3.4.4 D). Bei pH_e 7,5/ -75 mV lag ihr τ -Wert bei 0,32 s und war damit ca. 33-mal kleiner als der entsprechende Wert von ChR2-WT. Bei E123Q hing diese Kinetik ebenfalls vom extrazellulären pH-Wert ab. Zwischen pH_e 9/ -100 mV ($\tau_{\text{rec}} = 1,83$ s), pH_e 6 ($\tau_{\text{rec}} = 0,09$ s) und pH_e 4 ($\tau_{\text{rec}} = 0,07$ s) beschleunigte sich die Wiederherstellung des transienten Stroms.

Eine weitere auffällige Eigenschaft von E123Q war die Rotverschiebung seines Aktionsspektrums. Das Anregungsmaximum lag bei 498 nm und war damit gegenüber dem Wildtyp um etwa 20 nm verschoben (Abb. 3.4.19).

3.4.2 E123D

Aspartat ist wie Glutamat im deprotonierten Zustand negativ geladen, enthält aber ein Kohlenstoffatom weniger in der Seitengruppe und ist somit kürzer. Diese Substitution wurde vorgenommen, weil sich in BR an gleicher Position ebenfalls ein Aspartat befindet. E123D wurde bei der ersten elektrophysiologischen Charakterisierung von ChR2 bereits qualitativ unter neutralen Bedingungen untersucht [1] und fiel dabei durch ein kleines Verhältnis von stationärem zu transienten Strom auf, was ich hier bestätigen konnte.

In den aktuellen Experimenten war der durchschnittliche stationäre Strom bei pH_e 7,5/ -100 mV mit etwa 3,2 nA sehr klein (Abb. 3.4.1). Hier flossen aber auch nur die Werte ein, die auch messbar waren. In vielen Fällen waren wegen der kleinen Stromamplituden überhaupt keine Messungen möglich. Daher ist die Datenmenge bei dieser Mutante auch vergleichsweise klein. Die Strom/Spannungskurven von I_0

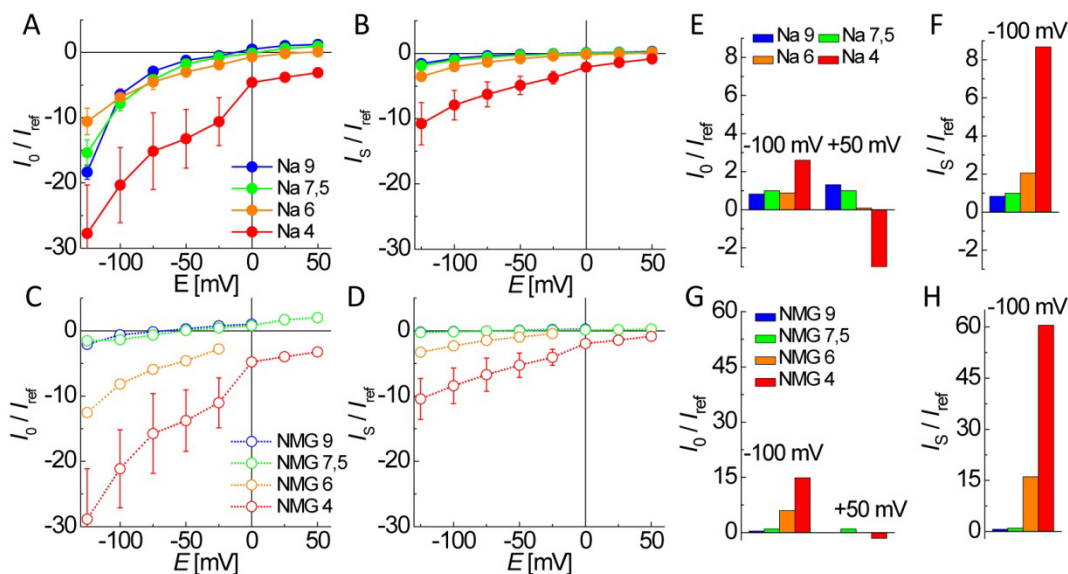


Abb. 3.4.6 E123D Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten. **A** I_0 und **(B)** I_S in NaCl. Die I_0 Kurven überschneiden sich im negativen Spannungsbereich. **C** I_0 und **(D)** I_S in NMG-Cl. Normierung aller Amplituden auf I_S bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV. **E** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_S) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. **G** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_S) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert.

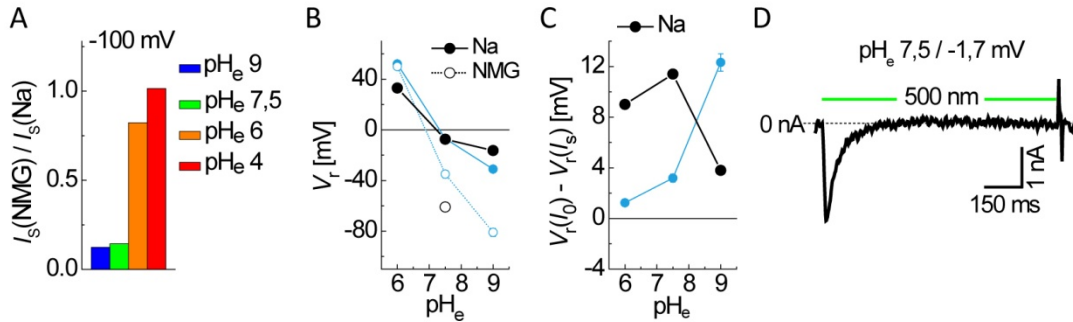


Abb. 3.4.7 E123D Umkehrpotentiale und Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl. **A** Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV. Der Anteil von Protonen am Einstrom stieg bei pH_e 6 sprunghaft an. **B** V_r des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ bei drei pH_e -Werten. **C** Differenzen zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_s . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ negativer als $V_r(I_s)$ (blau: ChR2-WT Werte). In Anwesenheit von extrazellulärem Na^+ war das Umkehrpotential von I_0 deutlich positiver als das von I_s . **D** Photostrom nahe am Umkehrpotential. Transienter und stationärer Strom haben klar getrennte Nulldurchgänge (grüner Balken: Lichtapplikation).

überschneiden sich bei hohen negativen Spannungen, wenn Natriumionen im Außenmedium waren (Abb. 3.4.6). Beim Übergang von pH_e 9 zu pH_e 6 kam zu einer Abnahme der Amplituden bei -125 mV. Bei -100 mV gab es geringere Schwankungen, aber bei pH_e 4 stieg I_0 auf das 2,6-fache des Referenzwertes bei pH_e 7,5. Die inhibitorische Wirkung von Protonen auf den Einstrom von Ladungsträgern scheint bei E123D ähnlich zu sein wie beim Wildtyp. Die Strom/Spannungskurven von I_s waren in NaCl klar voneinander getrennt. Bei pH_e 4/-100 mV gab es eine Steigerung des stationären Stroms um das 8,7-fache des Ausgangswertes. In NMG-Cl waren die Zunahmen stärker. I_0 und I_s entsprachen jeweils dem 14,9-fachen und dem 60,5-fachen des Referenzwertes bei pH_e 7,5/-100 mV. Hierbei ist anzumerken, dass für E123D nur eine Messreihe in NMG-Cl durchgeführt werden konnte und dieses Resultat daher nur einen qualitativen Eindruck vermittelt. Bei diesen Experimenten gab es unter physiologischen Bedingungen eine Abnahme des Einstroms gegenüber NaCl. Die Amplitude sank bei NMG-Cl/ pH_e 7,5/-100 mV auf 14,3% des Referenzwertes (Abb. 3.4.7-A).

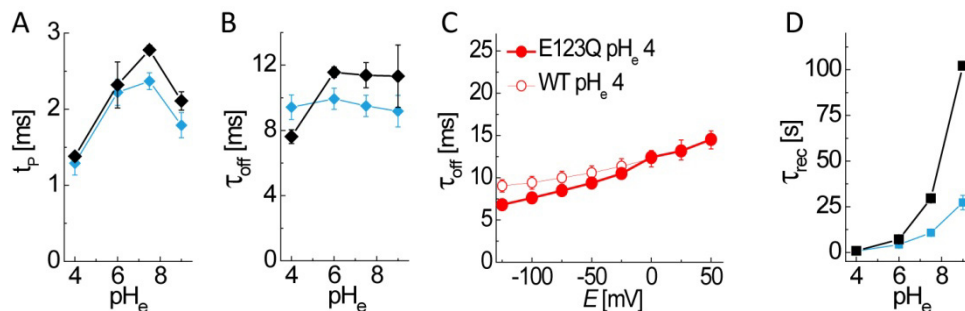


Abb. 3.4.8 E123D Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und Recovery Kinetik im Doppelpulsexperiment. **A** Dauer vom Laserblitz bis I_p und **(B)** τ -Werte der off-Kinetik bei -100 mV. Bei pH_e 7,5 waren die Öffnung und das Schließen des Kanals langsamer als beim Wildtyp (blau). **C** Spannungsabhängigkeit der off-Kinetik bei pH_e 4. Das Schließen des Kanals verlangsamte sich in Richtung positiver Spannungen. **D** τ -Werte der Recovery Kinetik bei -75 mV im Vergleich zu ChR2-WT (blau). Die Erholung des transienten Stroms war bei allen pH_e -Werten signifikant langsamer, beschleunigte sich bei sinkendem pH_e .

E123D Umkehrpotentiale

Das Umkehrpotential des stationären Stroms betrug bei Na_e/pH_e 7,5 ca. -7,5 mV und entsprach damit dem Wildtypwert (Abb. 3.4.7-B). Im Gegensatz dazu, war das I_0 Umkehrpotential ungewöhnlich positiv verschoben und lag bei +4,1 mV. Wegen der kleinen Photoströme konnten keine IV -Messungen in der Nähe des Umkehrpotentials durchgeführt werden. Die Werte stammen aus den Strom/Spannungskurven, bei denen es relativ große Abstände zwischen den Spannungssprüngen gab. Allerdings konnte durch eine Einzelmessung demonstriert werden, dass es bei E123D unter physiologischen Bedingungen (Na_e/pH_e 7,5) eine vergleichsweise große Differenz zwischen den I_0 und I_s Umkehrpotentialen gibt. Abb. 3.4.7-D zeigt die Stromspur einer E123D Probe, die unter Referenzbedingungen (-100 mV) einen ungewöhnlich hohen stationären Strom von -11,3 nA aufwies und bei einer Spannung von -1,7 mV aufgenommen wurde. Die Amplitude des stationären Stroms lag hier bei etwa 0 nA, wohingegen I_0 eine eindeutig negative Amplitude aufwies und damit ein positiv verschobenes Umkehrpotential haben muss. Das spricht für unterschiedliche Ionenselektivitäten von I_0 und I_s . Bei Na_e/pH_e 6 hatte der stationäre Strom ein Umkehrpotential von +33 mV, während der I_0 Wert um 9 mV auf $V_r = +42$ mV verschoben war. Unter basischen Bedingungen lag V_r bei -16,4 mV und im Gegensatz zu den anderen pH-Werten gab es hier zwischen I_0 und I_s nur eine Differenz von etwa 4 mV.

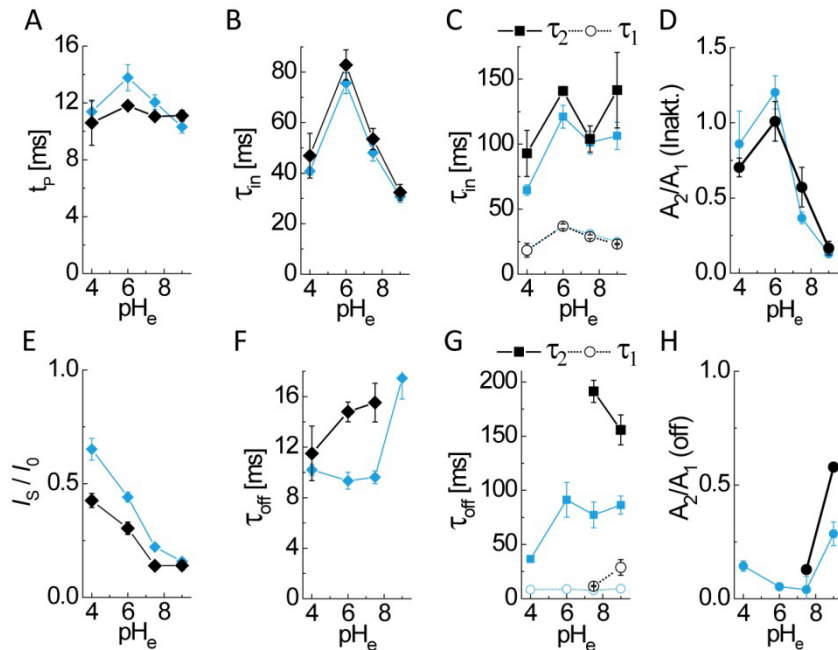


Abb. 3.4.9 E123D Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. (blau: ChR2-WT) **A** Länge des Intervalls bis zum transienten Strom (t_p). **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen und (**C**) biexponentiellen Fits sowie (**D**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **E** Das Verhältnis von I_s zu I_0 war kleiner als beim Wildtyp. **F** τ -Werte der off-Kinetik bei monoexponentiellen und (**G**) biexponentiellen Fits sowie (**H**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. Bei pH_e 7,5 war das Schließen des Kanals langsamer als bei ChR2-WT. Die langsame Komponente hatte eine größeren τ -Wert und höheren Anteil.

E123D Kinetiken

Durch die kleinen Stromamplituden, insbesondere unter basischen und neutralen Bedingungen, gab es nur wenige Messungen, aus denen die Kanalkinetiken ausgelesen werden konnten. Allerdings konnten einige Experimente mit Laserblitzanregung durchgeführt werden (Abb. 3.4.8). Hier erreichte der transiente Strom bei pH_e 7,5/ -100 mV sein Maximum nach 2,8 ms und fiel mit einem τ -Wert von 11,4 ms ab. Dass das Schließen der Pore von E123D eine deutliche Spannungsabhängigkeit hat, konnte man bei den relativ großen Photoströmen unter sauren Bedingungen sehen (Abb. 3.4.8-C). Deren τ_{off} -Werte wurden bei positiveren Spannungen größer und lagen zwischen 6,8 ms ($E = -125$ mV) und 14,5 ms ($E = +50$ mV).

Bei Anregung mit Lichtpulsen war das Intervall bis zum transienten Strom mit 11 ms unter neutralen Bedingungen etwas kürzer als beim Wildtyp (Abb. 3.4.9-A). Der Übergang zum transienten Strom war mit einem τ -Wert von 53,5 ms nur wenig langsamer als bei ChR2-WT. Ein interessanter Punkt war die gleiche pH_e -Abhängigkeit der Inaktivierung, die bei pH_e 6 ($\tau_{\text{in}} = 82,8$ ms) am langsamsten war. Die *off*-Kinetik war unter neutralen Bedingungen biexponentiell langsamer als die von ChR2-WT. Die langsame Komponente hatte dabei einen τ -Wert von 191 ms.

Das Verhältnis von I_s zu I_0 lag unter Referenzbedingungen bei ca. 0,14 und war damit deutlich kleiner als beim Wildtyp (Abb. 3.4.9-E). Bei pH_e 9 blieb der Anteil des stationären Stroms unverändert, nahm aber unter sauren Bedingungen zu, allerdings ohne die Wildtypwerte zu erreichen.

Die Wiederherstellung des transienten Stroms unter neutralen Bedingungen hatte einen τ -Wert von 29,5 s (Abb. 3.4.8-D). Mit zunehmender extrazellulärer Protonenkonzentration wurde diese Kinetik schneller. Bei pH_e 9/ -75 betrug der τ -Wert 102,2 s, bei pH_e 6 nur noch 7,1 s und sank schließlich auf 0,84 s bei pH_e 4.

E123D Aktionsspektrum

Das Maximum des E123D Aktionsspektrums war um etwa 7 nm auf 485 nm rotverschoben (Abb. 3.4.19).

3.4.3 E123T

In Halorhodopsin befindet sich an der Position von ChR2-E123 und BR-D85 ein Threonin. In vorherigen Studien mit BR konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Rest entscheidend an der Umwandlung von einer Protonen- in eine Chloridpumpe beteiligt ist, da die BR Mutante D85T wie Halorhodopsin Chloridionen pumpen kann [53,54]. Mit der analogen Mutation sollte geklärt werden, ob E123 an der Festlegung der Ionenselektivität von ChR2 beteiligt ist.

Unter Referenzbedingungen war die durchschnittliche, stationäre Stromamplitude von E123T mit ca. -21 nA etwa so groß wie die vom Wildtyp (3.4.1).

Die Strom/Spannungskurven von E123T überschneiden sich in NaCl nicht, da es bei steigender extrazellulärer Protonenkonzentration zu einer stetigen Zunahme des Einstroms und zu einer stetigen Abnahme des Ausstroms kam (Abb. 3.4.10). Bei

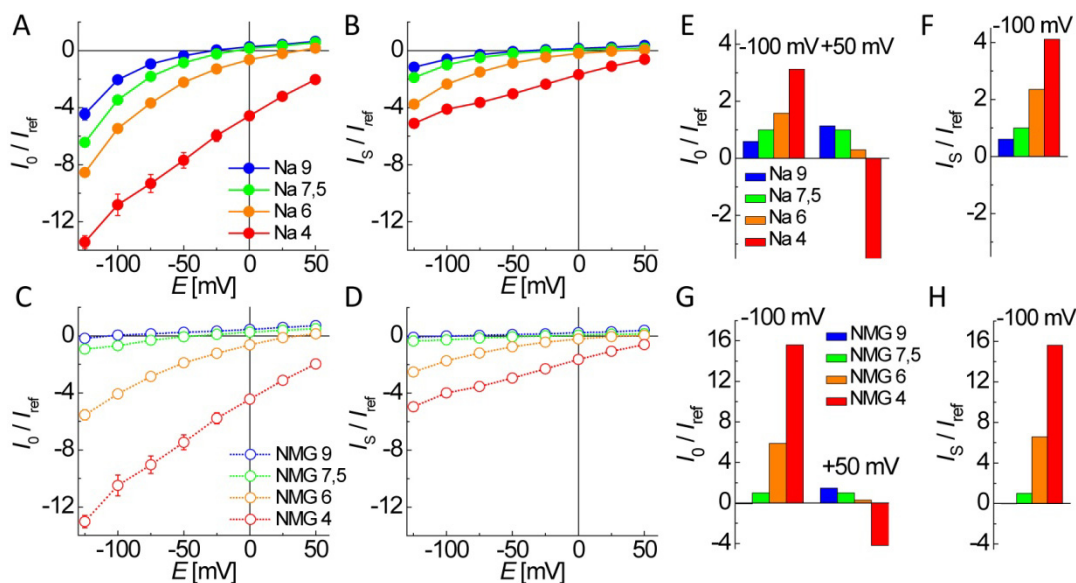


Abb. 3.4.10 E123T Strom/Spannungskurven. **A** I_0 und **(B)** I_S in NaCl. Die I/V -Kurven sind deutlich voneinander getrennt. **C** I_0 und **(D)** I_S Amplituden in NMG-Cl. Normierung aller Amplituden auf I_S bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV. **E** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_S) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. **G** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_S) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert.

pH_e 4/ -100 mV nahmen I_0 und I_S um das jeweils 3,1-fache und 4,1-fache des Wertes bei pH_e 7,5 zu. In NMG-Cl waren die Steigerungen für den Anfangs- und den stationären Strom sehr ähnlich und betrugen jeweils das 15,6-fache der Amplitude bei NMG_e/pH_e 7,5/ -100 mV.

Ohne Na^+ in den Messlösungen nahm der Einstrom gegenüber NaCl bei allen pH_e -Werten, außer pH_e 4 deutlich ab (Abb. 3.4.11-A). Hier ergab sich aber ein recht uneinheitliches Bild. Unter basischen Bedingungen war die Reduktion bei -100 mV sehr stark und der Photostrom änderte sogar seine Richtung in einen schwachen Nettoausstrom. Bei pH_e 7,5 sank die Amplitude auf 26% des Ausgangswertes und war damit noch relativ groß. Das galt auch für pH_e 6, wo der stationäre Strom in NMG-Cl mit 75% ebenfalls vergleichsweise groß war. Der Anteil von Protonen am Einstrom war gegenüber ChR2-WT vergleichsweise groß. Dennoch war deren inhibitorische Wirkung schwächer, da der Einstrom mit sinkendem pH_e -Werten deutlicher zunahm. Eine ausführlichere Diskussion zur Ionenselektivität von E123T findet in Kap. 4.2.2 statt.

E123T Umkehrpotentiale

Die Umkehrpotentiale des stationären Stroms waren in NaCl bei allen pH_e -Werten etwas negativer als beim Wildtyp und betrugen jeweils -34 mV (pH_e 9), -13 mV (pH_e 7,5) und +39 mV (pH_e 6) (Abb. 3.4.11-B). Die Differenz zum Umkehrpotential des Anfangsstroms war unter basischen und neutralen Bedingungen kleiner als bei ChR2-WT. Bei NMG_e/pH_e 9 lag das Umkehrpotential des stationären Stroms bei -99 mV und war gegenüber dem Wildtypwert negativ verschoben. Unter neutralen Bedingungen lag das Umkehrpotential bei -30 mV und

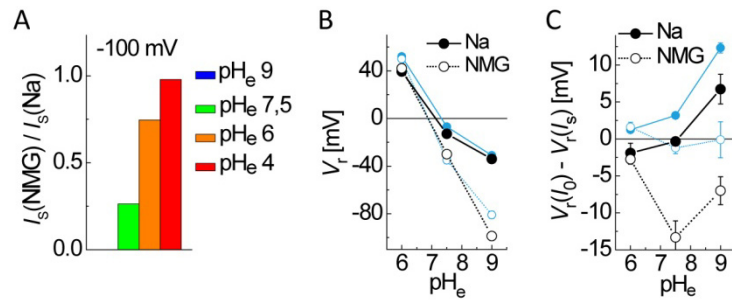


Abb. 3.4.11 E123T Umkehrpotentiale und Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl. **A** Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV. **B** V_r des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ bei drei pH_e -Werten. **C** Differenzen zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_s . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ negativer als $V_r(I_s)$ (blau: ChR2-WT). Bei pH_e 7,5 war in Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ das I_0 Umkehrpotential deutlich negativer als das von I_s .

war damit um 5 mV positiver als beim Wildtyp. Allerdings waren in NMG-Cl die Umkehrpotentiale von I_0 deutlich negativer als die des stationären Stroms. Die größte Differenz gab es mit $\Delta E = -13$ mV bei pH_e 7,5. Dies ist ein Indiz für unterschiedliche Ionenselektivitäten von I_0 und I_s . Offensichtlich war der Kaliumausstrom, der die negative Verschiebung des Umkehrpotentials in NMG-Cl bewirkt, in der Anfangsphase besonders hoch.

E123T Kinetiken

Die Kanalkinetiken nach Blitzlichtanregung waren sehr schnell und nur schwach von der Membranspannung abhängig (Abb. 3.4.12). Bei pH_e 7,5/-100 mV betrug die Zeit zum Erreichen des transienten Stroms (t_p) nach Aktivierung 0,9 ms und der τ -Wert der *off*-Kinetik war 3,9 ms. Das Öffnungsintervall blieb gegenüber dem äußeren pH-Wert relativ stabil, aber es gab eine leichte Verlangsamung bei pH_e 6 ($t_p = 1,1$) und pH_e 4 ($t_p = 1,2$). Die *off*-Kinetik blieb ebenfalls relativ stabil, wobei der τ -Wert bei pH_e 6 mit 5 ms ein Maximum hatte. Die *off*-Kinetiken der E123T Photoströme waren nach Blitzlichtanregung nur schwach von der Membranspannung abhängig. Bei pH_e 7,5 betrug die Differenz zwischen den τ -Werten bei -125 mV ($\tau_{\text{off}} = 3,3$ ms) und +50 mV ($\tau_{\text{off}} = 4,5$ ms) gerade 1,2 ms. Bei

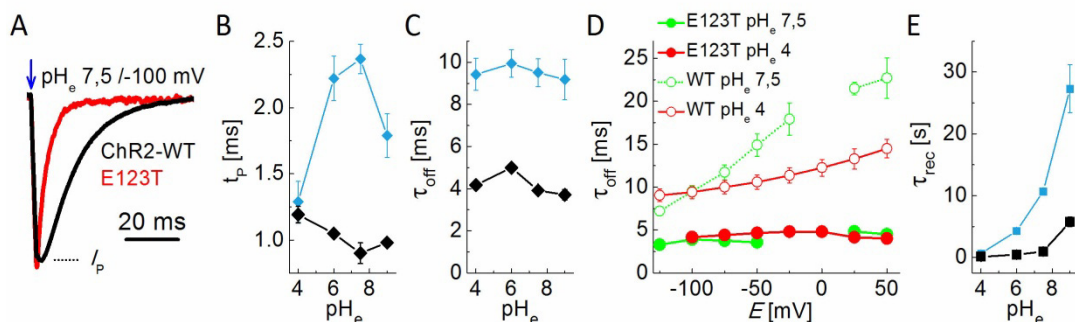


Abb. 3.4.12 E123T Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und Recovery Kinetik im Doppelpulsexperiment. **A** Photoströme vom Wildtyp (schwarz) und E123T (rot) nach Blitzlichtapplikation (blauer Pfeil). **B** Dauer vom Laserblitz bis I_p und (**C**) τ -Werte der *off*-Kinetik bei -100 mV. Kanalöffnung und das Schließen des Kanals waren gegenüber ChR2-WT (blau) signifikant beschleunigt. **D** Spannungsabhängigkeit der *off*-Kinetik bei pH_e 7,5 und pH_e 4. Das Schließen von E123T verlangsamte sich nicht in Richtung positiver Spannungen. **E** τ -Werte der *Recovery* Kinetik bei -75 mV im Vergleich zu ChR2-WT (blau). Die Erholung des transienten Stroms war bei allen pH_e -Werten signifikant beschleunigt.

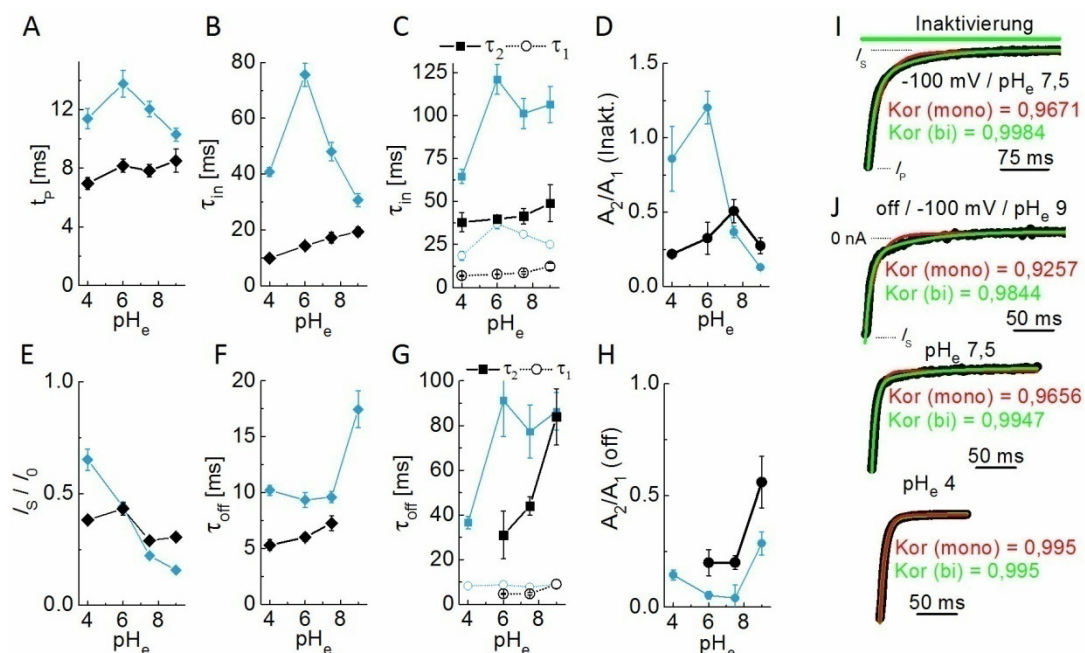


Abb. 3.4.13 pH_e-Abhängigkeit der E123T Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Die meisten Kanalkinetiken waren gegenüber ChR2-WT (blau) signifikant beschleunigt. **A** Länge des Intervalls bis zum transienten Strom (I_p). **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen und (**C**) biexponentiellen Fits sowie (**D**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **E** Verhältnis von I_s zu I_0 . **F** τ -Werte der off-Kinetik bei monoexponentiellen und (**G**) biexponentiellen Fits sowie (**H**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **I** Übergang des Photostroms (schwarz) vom transienten Strom zu I_s , bei pH_e 7,5/ -100 mV, mit mono- (rot) und biexponentiellem (grün) Fit und deren Korrelationskoeffizienten (Kor) (grüner Balken: Lichtapplikation). **J** off-Strom (schwarz) nach Ende der Lichtapplikation, mit mono- und biexponentiellen Fits, bei -100 mV, pH_e 9; 7,5 und 4.

pH_e 4 konnten alle Photoströme aufgrund ihrer Größe am besten ausgewertet werden. Der Unterschied zwischen den τ -Werten bei -125 mV ($\tau_{\text{off}} = 4,2$ ms) und +50 mV ($\tau_{\text{off}} = 4$ ms) war nur geringfügig, aber bei -25 mV ($\tau_{\text{off}} = 4,8$ ms) und 0 mV ($\tau_{\text{off}} = 4,8$ ms) verlangsamte sich das Schließen des Kanals etwas (Abb. 3.4.12-D).

Bei Anregung mit Lichtpulsen war das Intervall zum transienten Strom kürzer als beim Wildtyp und betrug bei pH_e 7,5/ -100 mV ca. 7,8 ms (Abb. 3.4.13-A). Nach Ende der Lichtapplikation fiel der stationäre Strom ebenfalls mit einer biexponentiellen Kinetik ab. Das Amplitudenverhältnis von langsamer ($\tau_2 = 44$ ms) zu schneller Komponente ($\tau_1 = 4,7$ ms) war mit $A_2/A_1 = 0,2$ größer als bei ChR2-WT. Die zweite Komponente wurde bei niedrigen pH_e-Werten schneller, wodurch bei pH_e 4 die off-Kinetik gut durch eine monoexponentielle Funktion angepasst werden konnte (Abb. 3.4.13-F). Das Verhältnis von I_s zu I_0 Strom betrug unter Referenzbedingungen ca. 0,3. Bei pH_e 9 gab es hier keine Veränderung. Allerdings gab es bei pH_e 6 eine deutliche Zunahme auf $I_s/I_0 = 0,43$, wobei der Quotient mit $I_s/I_0 = 0,39$ beim Übergang zu pH_e 4 relativ stabil blieb (Abb. 3.4.13-E).

Die Recovery Kinetik hatte sich gegenüber ChR2-WT deutlich beschleunigt (Abb. 3.4.12-E). Bei pH_e 7,5/ -75 mV betrug der τ -Wert gerade 0,98 s. Allerdings war diese Kinetik ebenfalls vom pH_e-Wert abhängig. Unter basischen Bedingungen

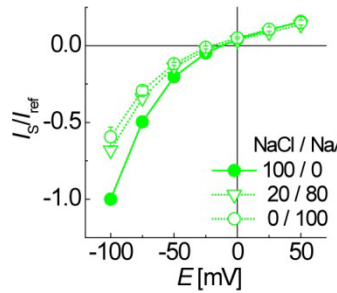


Abb. 3.4.14 E123T IV-Kurven in Natriumaspartat bei pH_e 7,5. Bei den Messungen wurden die extrazellulären Chloridionen durch Aspartat ersetzt. Dies führte zur Reduktion des Einstroms und zur negativen Verschiebung des Umkehrpotentials.

verlangsamte sie sich und hatte einen τ -Wert von 5,8 s, während sie bei pH_e 6 ($\tau_{\text{rec}} = 0,48$ s) und pH_e 4 ($\tau_{\text{rec}} = 0,13$ s) beschleunigte. Offensichtlich hat sich der Photozyklus von E123T gegenüber dem Wildtyp erheblich beschleunigt. Eine ausführliche Diskussion dazu findet in Kap. 4.2.2 statt.

E123T Chloridselektivität

Um zu überprüfen ob E123T Chloridionen leitet, habe ich in einer einzelnen Testreihe die extrazelluläre Chloridkonzentration von 100 mM abgesenkt und durch Aspartat ersetzt (Abb. 3.4.14). Die Natriumkonzentration blieb konstant bei 100 mM (pH_e 7,5). Die hier auftretenden Effekte waren denen in ChR2-WT sehr ähnlich. Bei einem Chloridanteil von 20% sank die stationäre Amplitude bei -100 mV auf 68% des Ausgangswertes in NaCl. Ohne Chlorid im Außenmedium betrug die Amplitude nur noch 59%. Das Umkehrpotential des stationären Stroms verschob sich dabei von $V_r = -12$ mV (100 mM Cl^-) auf $V_r = -19$ mV (100 mM Aspartat $^-$). Eine Chloridleitfähigkeit kann unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden, da sich das Umkehrpotential sonst in Richtung positiver Werte verschoben hätte.

E123T Aktionsspektrum

Das Aktionsspektrum von E123T war gegenüber ChR2-WT um fast 20 nm rotverschoben und erreichte sein Maximum bei 497 nm (Abb. 3.4.19).

3.3.4 E123A

Nachdem in Bakteriorhodopsin Aspartat 85 gegen Alanin ausgetauscht wurde, kam es zu einer drastischen Verlangsamung des Photozyklus und zum Verschwinden der Pumpaktivität [52]. In ChR2-E123A gab es hingegen keine vergleichbaren Auswirkungen auf die Kanalaktivität. Der stationäre Photostrom lag unter Referenzbedingungen bei durchschnittlich -18 nA (Abb. 3.4.1). Der Einstrom von Ladungsträgern nahm in NaCl zwischen pH_e 9 und pH_e 4 stetig und deutlich zu (Abb. 3.4.15). Bei pH_e 4/ -100 mV waren die Amplituden von I_0 und I_s um das jeweils 8-fache und 8,7-fache des Referenzwertes bei pH_e 7,5 angewachsen. Die Zuwachsraten waren damit größer als beim Wildtyp, aber bei E123A für I_0 und I_s in etwa gleich groß. Das gilt auch für NMG-Cl, wo die Amplituden bei pH_e 4 jeweils

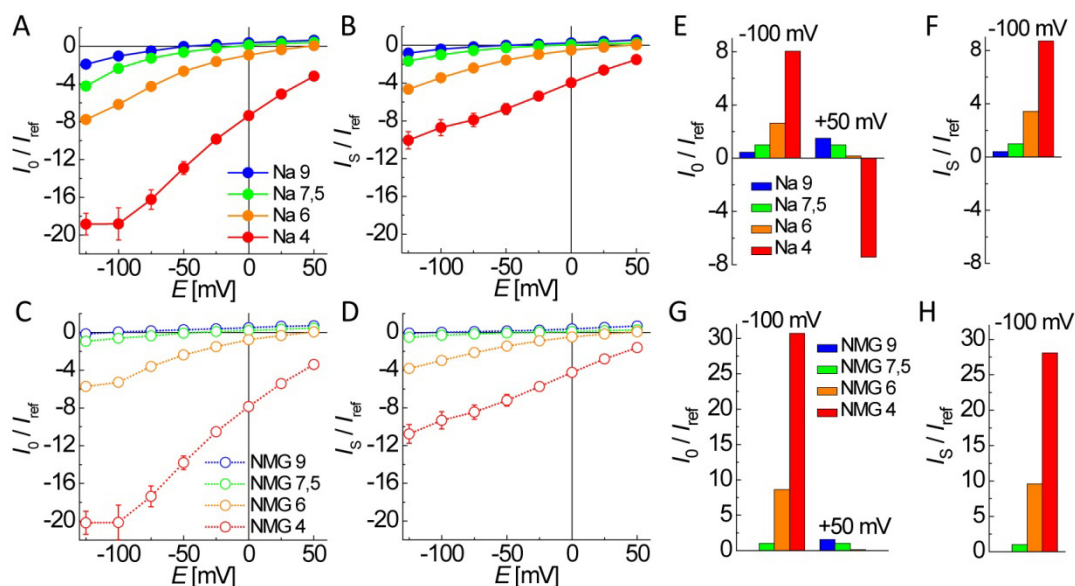


Abb. 3.4.15 E123A Strom/Spannungskurven. **A** I_0 und **(B)** I_S in NaCl. Die I_0 Kurven sind deutlich voneinander getrennt. **C** I_0 und **(D)** I_S in NMG-Cl. Normierung aller Amplituden auf I_S bei Na_e/ pH_e 7,5/ -100 mV. **E** pH_e-Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_S) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. **G** pH_e-Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_S) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert.

31-mal (I_0) und 28-mal (I_S) so groß waren, wie die entsprechenden Ströme bei pH_e 7,5/ -100 mV. Ein besonderes Merkmal war hierbei, dass der Anfangsstrom einen stärkeren pH-abhängigen Anstieg aufwies als der stationäre Strom, dessen Zunahme außerdem kleiner war als bei Chr2-WT.

Ohne Natriumionen im Außenmedium nahm der Einstrom ab und bei pH_e 9/ -100 mV gab es sogar einen schwachen Nettoausstrom. Dagegen waren die Abnahmen bei pH_e 7,5 und pH_e 6 weitaus geringer als bei Chr2-WT. Die Amplituden sanken jeweils auf 31% und 85% gegenüber den Referenzwerten in NaCl (Abb. 3.4.16-A). Der Anteil von Protonen am Einstrom stieg mit sinkenden pH_e-Werten deutlich an.

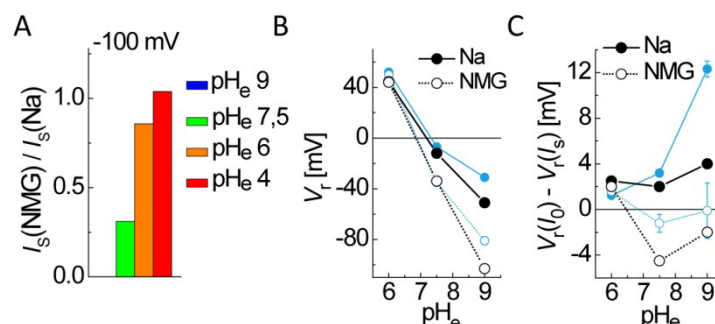


Abb. 3.4.16 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl und Umkehrpotentiale von E123A. **A** Verhältnis von I_S in NMG-Cl zu I_S in NaCl bei -100 mV. Der Anteil von Protonen am Einstrom nahm bei sinkendem pH_e stetig zu. **B** V_r des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na⁺ drei pH_e-Werten. **C** Differenzen zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_S . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ negativer als $V_r(I_S)$ (blau: Chr2-WT). Bei pH_e 7,5 war in Abwesenheit von extrazellulärem Na⁺ das Umkehrpotential von I_0 deutlich negativer als das von I_S .

Trotzdem war deren inhibitorische Wirkung schwächer als beim Wildtyp, da der Einstrom von Ladungsträgern deutlich zunahm. Eine ausführliche Diskussion dazu findet in Kap. 4.2.2 statt.

E123A Umkehrpotentiale

Die Umkehrpotentiale der stationären Ströme von E123A waren gegenüber den Wildtypwerten negativ verschoben. Bei Na_e/pH_e 9, pH_e 7,5 und pH_e 6 betrugen sie jeweils -51 mV, -12 mV und +46 mV (Abb. 3.4.16-B). Bei Na_e/pH_e 9 lagen die Umkehrpotentiale von I_0 (-47 mV) und I_S um ca. 4 mV auseinander. Allerdings waren bei NMG_e/pH_e 9 und pH_e 7,5 die Umkehrpotentiale von I_0 gegenüber I_S deutlich negativer. Daher scheint unter diesen Bedingungen bei E123A ein höherer Kaliumausstrom in der Anfangs- als in der stationären Phase vorzuliegen, der klar für eine unterschiedliche Ionenselektivität von I_0 und I_S spricht.

E123A Kinetiken

Die Kanalöffnung und das Schließen von E123A beschleunigten sich gegenüber dem Wildtyp. Unter Referenzbedingungen erreichte der Photostrom nach Blitzlichtanregung sein Maximum bereits nach 0,73 ms und fiel mit einem τ -Wert von 4 ms ab (Abb. 3.4.17-B+C). Bei pH_e 4/ -100 mV waren die Kanalöffnung ($t_p = 0,92$ ms) und das Schließen des Kanals ($\tau_{\text{off}} = 5$ ms) etwas langsamer. Außerdem waren die Kanalkinetiken insgesamt stärker vom extrazellulären pH-Wert abhängig als E123T und E123Q. Unter neutralen Bedingungen verdoppelte sich der τ -Wert der *off*-Kinetik zwischen -125 mV ($\tau_{\text{off}} = 3,6$ ms) und +50 mV ($\tau_{\text{off}} = 7$ ms) nahezu. Das gleiche galt für pH_e 4, wo der Photostrom bei -125 mV mit einem τ -Wert von 4,5 ms und bei +50 mV mit 9,3 ms abfiel (Abb. 3.4.17-D).

Bei Anregung mit Lichtpulsen waren die Kanalkinetiken im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls schneller. Bei pH_e 7,5/ -100 mV hatte das Intervall zum transienten Strom eine Länge von 7,2 ms (Abb. 3.4.18-A). Die *off*-Kinetik war

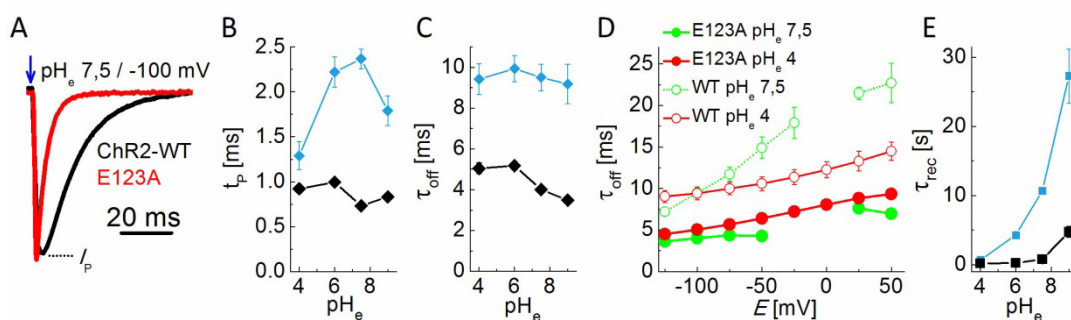


Abb. 3.4.17 E123A Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und Recovery Kinetik im Doppelpulsexperiment. **A** Photoströme vom Wildtyp (schwarz) und E123A (rot) nach Blitzlichtapplikation (blauer Pfeil) im Vergleich. **B** Dauer vom Laserblitz bis I_p und **(C)** τ -Werte der *off*-Kinetik bei -100 mV. Kanalöffnung und das Schließen des Kanals waren gegenüber ChR2-WT (blau) signifikant beschleunigt. **D** Spannungsabhängigkeit der *off*-Kinetik bei pH_e 7,5 und 4. In Richtung positiver Spannungen war das Schließen des Kanals verzögert. **E** τ -Werte der *Recovery* Kinetik bei -75 mV im Vergleich zu ChR2-WT (blau). Die Erholung des transienten Stroms war bei allen pH_e -Werten gegenüber dem Wildtyp signifikant beschleunigt.

biexponentiell ($\tau_2 = 29,8$ ms; $\tau_1 = 4,3$ ms), wobei der Anteil der langsamen Komponente mit 12% größer war als bei ChR2-WT. Dieser Anteil stieg bei pH_e 9/ -100 mV auf 18% und die Kinetik hatte einen stärkeren biexponentiellen Charakter (Abb. 3.4.18-J). Dieser nahm mit steigender extrazellulärer Protonenkonzentration ab, da der Anteil der langsamen Komponente sank. Dadurch konnte die *off*-Kinetik unter sauren Bedingungen durch monoexponentielle Funktionen angepasst werden (Abb. 3.4.18-F). Das gleiche galt für die Inaktivierung, die dadurch insgesamt schneller wurde. Das Verhältnis von I_S zu I_0 war mit jeweils 0,43 und 0,39 bei pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 9 vergleichsweise hoch. Bei pH_e 6 stieg der Quotient auf $I_S/I_0 = 0,56$ an, um bei pH_e 4 wieder auf $I_S/I_0 = 0,47$ abzufallen (Abb. 3.4.18-E). Die Wiederherstellung des transienten Stroms erfolgte bei E123A schneller als beim Wildtyp (Abb. 3.4.17-E). Der τ -Wert der *Recovery* Kinetik betrug bei pH_e 7,5/ -75 mV ca. 0,78 s. Bei pH_e 9 stieg er dagegen auf 4,74 s und fiel bei pH_e 6 und pH_e 4 auf jeweils 0,24 s und 0,16 s ab. Offensichtlich hat sich der Photozyklus von E123A gegenüber dem Wildtyp erheblich beschleunigt. Eine ausführliche Diskussion dazu findet in Kap. 4.2.2 statt.

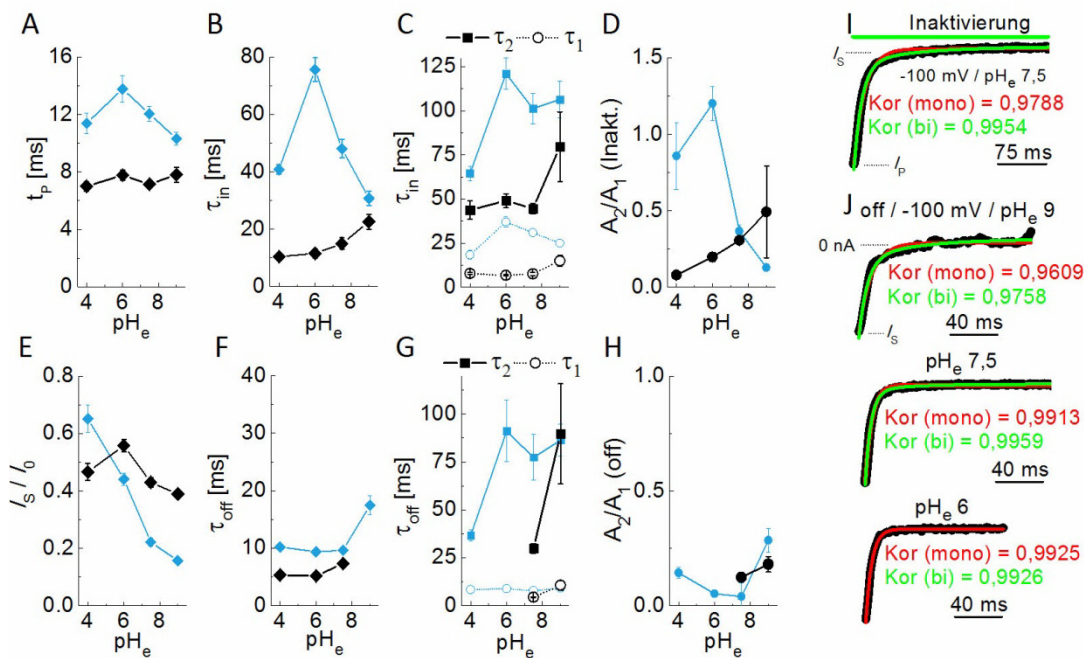


Abb. 3.4.18 pH_e-Abhängigkeit der E123A Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Die meisten Kanalkinetiken waren gegenüber ChR2-WT (blau) signifikant beschleunigt. **A** Länge des Intervalls bis zum transienten Strom (I_P). **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen und (**C**) biexponentiellen Fits sowie (**D**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **E** Verhältnis von I_S zu I_0 . **F** τ -Werte der *off*-Kinetik bei monoexponentiellen und (**G**) biexponentiellen Fits sowie (**H**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **I** Übergang des Photostroms (schwarz) von I_P zu I_S , bei pH_e 7,5/ -100 mV, mit mono- (rot) und biexponentiellem (grün) Fit und deren Korrelationskoeffizienten (Kor) (grüner Balken: Lichtapplikation). **J** *off*-Strom (schwarz) nach Ende der Lichtapplikation, mit mono- und biexponentiellen Fits, bei -100 mV, pH_e 9; 7,5 und 6.

E123A Aktionsspektrum

Die Mutation verschob das Maximum des Aktionsspektrums um ca. 9 nm auf 487 nm (Abb. 3.4.19).

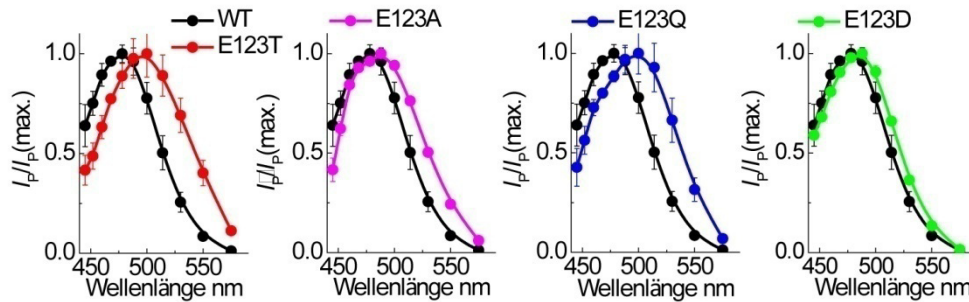


Abb. 3.4.19 Aktionsspektren der E123X Mutanten. Die Konstrukte wurden mit Laserpulsen verschiedener Wellenlängen angeregt und die resultierenden I_p Ströme auf die höchste Aktivität normiert ($I_p(\max.)$). E123T (rot) und E123Q (blau) hatten gegenüber dem Wildtyp (schwarz) deutliche rotverschobene Absorptionsmaxima (~20nm). Dagegen fielen die Rotverschiebungen bei E123A (magenta, ~10 nm) und E123D (grün, ~7 nm) etwas geringer aus.

3.4.5 E123L

Der Austausch von Glutamat zu Leucin bewirkte eine dramatische Reduzierung der Photoströme, die zum Großteil keine weiteren Experimente zuließen. Insgesamt konnte nur bei zwei Messungen die IV -Kurve des stationären Stroms bei Na_e/pH_e 7,5 und pH_e 4 aufgenommen werden (Abb. 3.4.20).

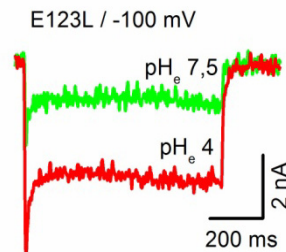


Abb. 3.4.20 Photoströme von E123L bei pH_e 7,5 (grün) und pH_e 4 (rot).

3.5 D253 Mutationen und E235Q

3.5.1 D253N

Aspartat 253 befindet sich an der gleichen Position wie D212 in Bakteriorhodopsin (BR), das dort neben D85 ein essentieller Bestandteil des komplexen Gegenions ist (Abb. 1.8). Mutationen an dieser Stelle können den Photozyklus von BR erheblich verlangsamen [52].

Chr2-D253N zeigte in den elektrophysiologischen Untersuchungen gegenüber dem Wildtyp eine deutlich reduzierte Aktivität (Abb. 3.5.1). Unter Referenzbedingungen erreichte der stationäre Strom eine durchschnittliche

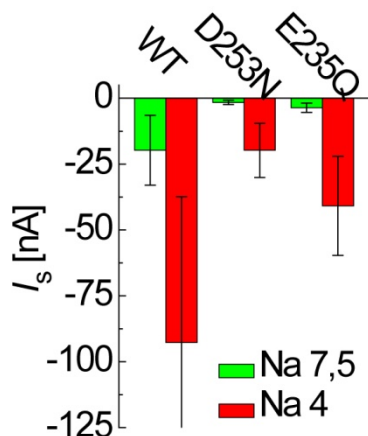


Abb. 3.5.1 Durchschnittliche stationäre Photoströme von D253N und E235Q. I_s bei pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4/ -100 mV.

Amplitude von -1,6 nA. Dadurch war die Zahl möglicher Experimente stark eingeschränkt. Allerdings zeichnete sich D253N durch eine sehr auffällige Eigenschaft aus. Die Photoströme nahmen unter sauren Bedingungen bei pH_e 4 deutlich zu (Abb. 3.5.2). Die Amplituden von I_0 und I_s bei -100 mV waren in NaCl gegenüber pH_e 7,5 um das jeweils 14-fache und das 13-fache größer. Im Vergleich zum Wildtyp ist das eine sehr starke pH_e -Abhängigkeit, die ausführlicher in Kap. 4.2.3 besprochen wird.

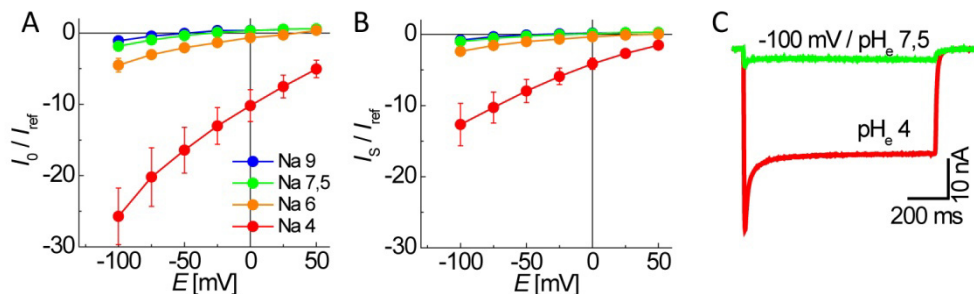


Abb. 3.5.2 D253N Strom/Spannungskurven A I_0 und **(B)** I_s Amplituden in NaCl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV normiert. Die IV-Kurven sind klar voneinander getrennt. Die Zunahme des Einstroms war beim Übergang zu höheren extrazellulären Protonenkonzentrationen relativ groß. **C** Photoströme unter Dauerlicht bei -100 mV ($[\text{Na}^+]_e = 100$ mM).

3.5.2 D253E

Bei dieser Mutante waren die Photoströme unter neutralen Bedingungen in der Regel nicht messbar. Durch eine Einzelmessung mit einem stationären Strom von -0,6 nA bei -100 mV konnte jedoch gezeigt werden, dass D253E prinzipiell Ionen leiten kann. Bei Na_e/pH_e 4 stieg die Amplitude auf das 6,5-fache ihres Ausgangswertes an (Abb. 3.5.3).

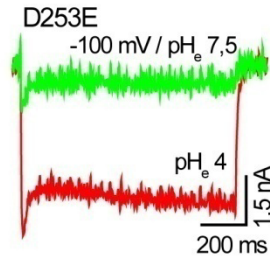


Abb. 3.5.3 D253E Photoströme bei pH_e 7,5 und pH_e 4 ($[\text{Na}^+]_e = 100 \text{ mM}$)

3.5.3 E235Q

Glutamat 235 ist die einzige Aminosäure die aus der sogenannten *Proton Release Group* von BR noch in ChR2 konserviert ist (Abb. 1.8). Diese Gruppe befindet sich nahe der Oberfläche, auf der extrazellulären Seite des Proteins. In BR führte die E194Q Mutation zu einer verzögerten Abgabe des gepumpten Protons [55].

In ChR2 waren die Photoströme von E235Q unter Referenzbedingungen sehr klein (-3,6 nA), so dass zunächst von einem inaktiven Kanal ausgegangen werden musste. Bei Na_e/pH_e 4/ -100 mV kam es aber zu einer deutlichen Zunahme der Aktivität. Hier vergrößerte sich beispielsweise der stationäre Strom auf das 12,7-fache des Ausgangswertes bei pH_e 7,5 (Abb. 3.5.2).

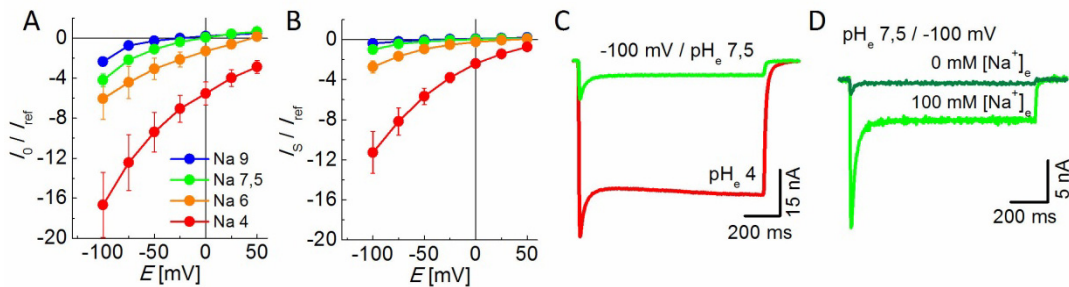


Abb. 3.5.4 E235Q Strom/Spannungskurven. **A** I_0 und **(B)** I_s Amplituden in NaCl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV normiert. Die IV-Kurven sind klar voneinander getrennt. Der Einstrom nahm bei sinkendem pH_e deutlich zu. **C** Photoströme bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV und pH_e 4, bei Anregung mit Lichtpulsen. **D** Photoströme bei pH_e 7,5/ -100 mV in NaCl und NMG-Cl. Der Anteil von Protonen am Einstrom war ähnlich wie bei ChR2-WT.

3.6 T159 Mutationen und T159C Derivate

Die Mutation T159C sind wegen der sehr großen Photoströme für die Anwendung in der Neurophysiologie besonders interessant. Deswegen habe ich sie und die daraus abgeleiteten Varianten intensiv unter physiologischen Bedingungen charakterisiert (100 mM Na_e/pH_e 7,5). Zudem wurden die Testreihen und deren Auswertung so gestaltet, dass sie einen direkten Vergleich zwischen ChR2-WT, T159C, H134R und weiteren Varianten erlaubten. Der Vergleich mit H134R war deswegen nötig, weil dieses Konstrukt wegen der hohen Photoströme bereits in der Neurophysiologie Anwendung findet [43]. Außerdem habe ich mit T159C

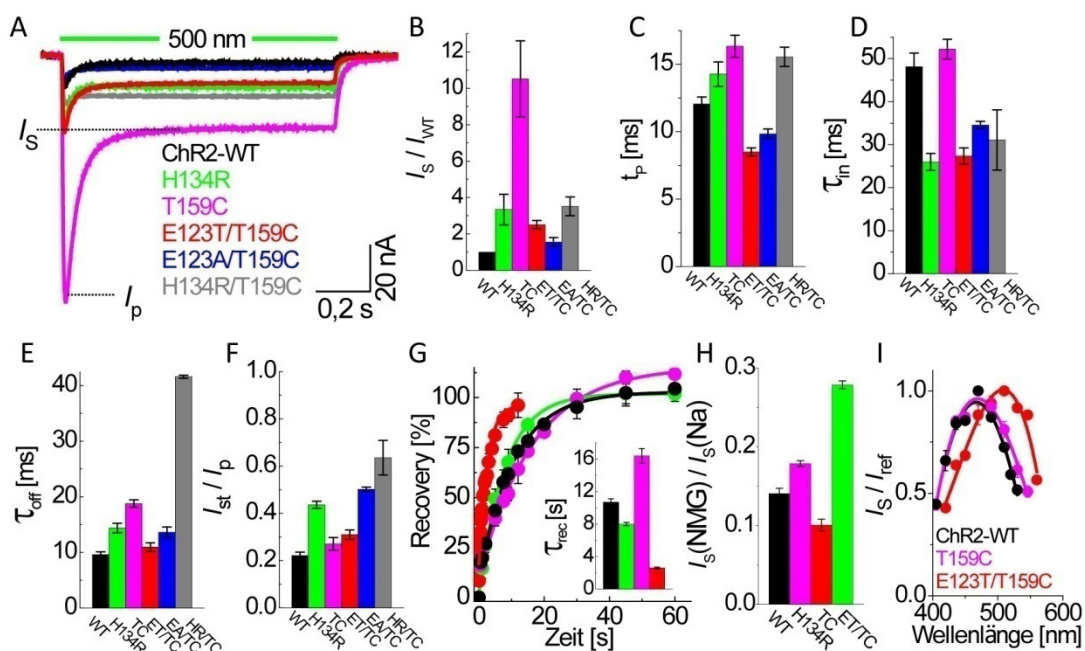


Abb. 3.6.1 Vergleich von ChR2-WT, T159C (TC), H134R, E123T/T159C (ET/TC), E123A/T159C (EA/TC) und H134R/T159C (HR/TC) unter physiologischen Bedingungen, bei Aktivierung mit Lichtpulsen. **A** Typische Photoströme die den Durchschnittsamplituden bei -100 mV entsprachen. **B** Zunahme des stationären Stroms (I_s) gegenüber den Wildtypwerten. Die Amplituden wurden auf die Wildtypwerte des jeweiligen Messtages normiert. T159C hatte einen ca. 10-mal größeren stationären Photostrom als der Wildtyp. **C** Dauer vom Anregungsbeginn bis zum Erreichen des transienten Stroms (I_p). **D** τ -Werte der Inaktivierung (-100 mV) (**E**) und der *off*-Kinetik bei monoexponentiellen Fits. **F** Verhältnis von I_s zu I_0 bei -100 mV. **G** *Recovery* Kinetik von ChR2-WT (schwarz), H134R (grün), TC (magenta) und ET/TC (rot) sowie deren τ -Werte (inset) bei -75 mV. **H** Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV. Insgesamt waren die Kinetiken von T159C langsamer als die des Wildtyps. In Kombination mit E123T (ET/TC) konnten sie aber signifikant beschleunigt werden. **I** Aktionsspektren von WT, TC und ET/TC. Das Spektrum von T159C war gegenüber dem Wildtyp unverändert. Das Anregungsmaximum von E123T/T159C war dagegen um ca. 30 nm rotverschoben.

Experimente wiederholt, für die große Amplituden vorteilhaft sind. Dadurch konnten einige Resultate, wie die Differenz der Umkehrpotentiale von I_0 und I_s , die Spannungsabhängigkeit der Kanalkinetiken oder die Calciumleitfähigkeit (Kap. 3.1) bestätigt werden.

3.6.1 Basischarakterisierung von T159C

In den bisherigen Vergleichen der stationären Photoströme, habe ich die Durchschnittswerte aus allen verfügbaren Messungen bei pH_e 7,5/ -100 mV gebildet. Dabei wurde aber nicht berücksichtigt, dass die Amplitude einer Mutante an verschiedenen Messtagen sehr unterschiedlich sein kann. Der entscheidende Faktor ist hierbei die Anzahl exprimierter Kanäle pro Zelle, die wiederum stark von der Qualität und Größe der Oocyten sowie von der Expressionsdauer abhängt. Dadurch unterlagen die Stromamplituden Schwankungen, die sich in relativ großen Standardfehlern widerspiegeln. Trotzdem erlaubte diese Vorgehensweise qualitative Aussagen über die Leitfähigkeit einzelner Konstrukte. Da aber der große

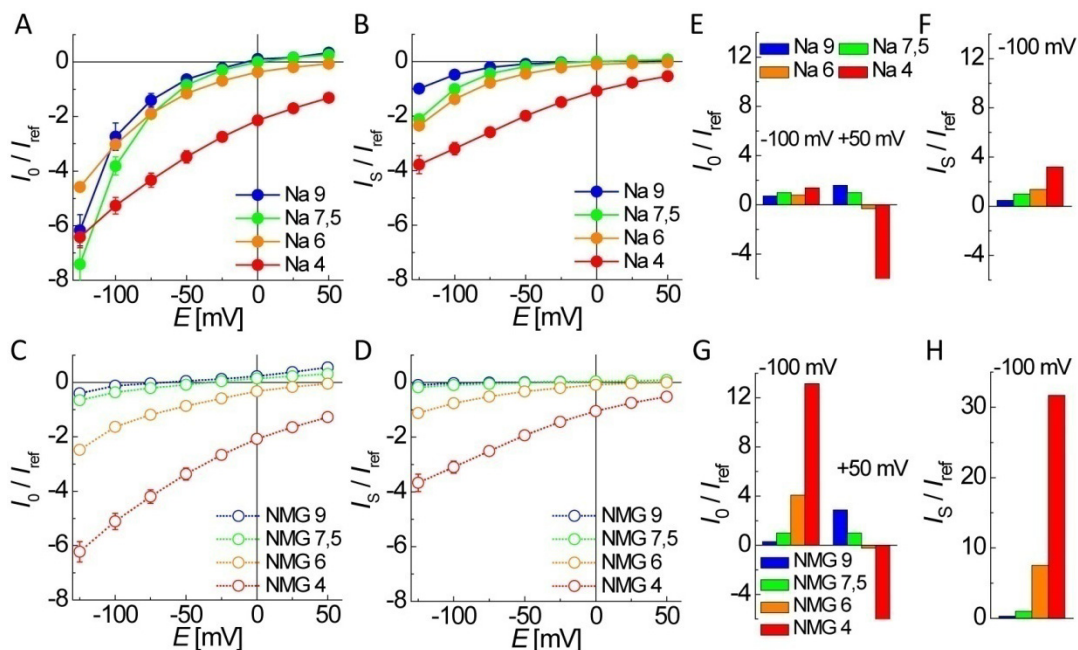


Abb. 3.6.2 T159C Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten. **A** I_0 und **(B)** I_S in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). Wie beim Wildtyp überschneiden sich die I_0 Kurven. **(C)** I_0 und **(D)** I_S in NMG-Cl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV normiert. **E** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(F)** der stationären Phase (I_S) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. Der I_0 -Einstrom nahm mit sinkendem pH_e kaum zu. **G** pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms während der Anfangsphase (I_0) und **(H)** der stationären Phase (I_S) in NMG-Cl. Dazu wurden die Amplituden bei -100 mV und +50 mV auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert. In Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ nahm der I_0 -Einstrom bei sinkendem pH_e stetig zu.

Photostrom von T159C eines der herausragenden Merkmale ist, habe ich versucht, die Zunahme gegenüber Chr2-WT und H134R zu quantifizieren. Daher habe ich parallel zu T159C immer die Stromamplituden vom Wildtyp und H134R gemessen, deren RNA zeitgleich in Oocyten injiziert wurde. Während der Testreihen unterlagen die Photoströme großen Schwankungen. Wenn in einer Oocytenlieferung die Größe oder Qualität der Zellen zu großen oder kleinen Photoströmen führte, wirkte sich dies in der Regel auf alle Konstrukte gleichermaßen aus. Durch die Normierung der Stromamplituden der Chr2 Varianten auf den Wildtypwert konnte deren relative Zunahme dokumentiert werden. Wie in Abbildung 3.6.1-B zu sehen ist, nahm der stationäre Strom von H134R unter Referenzbedingungen um das 3,3-fache gegenüber Chr2-WT zu. Die T159C Amplitude war allerdings 10,5-mal größer als die des Wildtyps.

Die Strom/Spannungskurven von T159C wiesen eine ähnliche Charakteristik wie die des Wildtyps auf (Abb. 3.6.2). Die I_0 -Kurven überschneiden sich in NaCl bei hohen negativen Spannungen, während die Amplituden des stationären Stroms klar voneinander getrennt waren. Das bedeutet, dass der Einstrom von Kationen beim Anfangsstrom unter sauren Bedingungen teilweise abnahm. Zum Beispiel betrug bei Na_e/pH_e 6/ -100 mV die I_0 -Amplitude nur das 0,8-fache des Referenzwertes von pH_e 7,5, während sie bei pH_e 4 gerade auf das 1,4-fache anstieg. Wie beim Wildtyp gab es aber eine deutlichere pH_e -Abhängigkeit des Einstroms in der

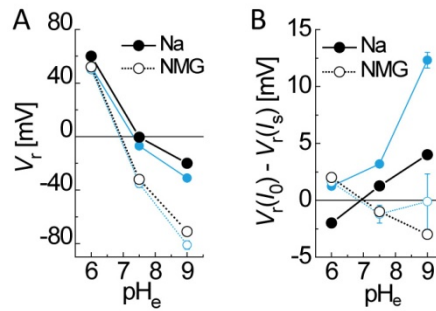


Abb. 3.6.3 Umkehrpotentiale von T159C in NaCl und NMG-Cl bei drei pH_e -Werten. A Umkehrpotentiale des stationären Stroms in NaCl und NMG-Cl. Die Umkehrpotentiale von T159C waren gegenüber dem Wildtyp (blau) positiv verschoben. **B** Differenz zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_S . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ gegenüber $V_r(I_S)$ negativ verschoben. Bei Na_e/pH_e 9 war die Differenz nicht so ausgeprägt wie beim Wildtyp.

stationären Phase. I_S nahm bei -100 mV mit steigender extrazellulärer Protonenkonzentration stetig zu. Bei Na_e/pH_e 4 hatte die Amplitude bereits die 3,2-fache Größe des Referenzwertes erreicht. In NMG-Cl waren die Strom/Spannungskurven von I_0 und I_S klar getrennt. Hier zeigte sich aber ebenfalls eine stärkere pH_e -Abhängigkeit des stationären Stroms, da er bei NMG_e/pH_e 4/ -100 mV ca. 31,7-mal größer war als bei pH_e 7,5. Bei I_0 betrug die Steigerung gerade das 14,9-fache des Ausgangswertes.

In NMG-Cl kam es gegenüber NaCl zu einer deutlichen Reduktion des Einstroms. Zum Beispiel sank I_S bei NMG_e/pH_e 9/ -100 mV auf 6%. Bei pH_e 7,5 und pH_e 6 betrug die Abnahme jeweils 10% und 54%, während bei pH_e 4 keine Reduktion des Einstroms mehr auftrat (Tab. 3.8.6).

T159C Umkehrpotentiale

Bei den Umkehrpotentialen gab es leichte Abweichungen gegenüber den Wildtypwerten. Sie waren in der Regel etwas positiv verschoben (Abb. 3.6.3). In NaCl lag das Umkehrpotential von I_S beispielsweise bei -1 mV und verschob sich unter basischen Bedingungen auf $V_r = -20$ mV. Hier gab es eine Differenz zum Umkehrpotential von I_0 , das bei $V_r = -16$ mV lag. Allerdings fiel dieser Unterschied damit geringer aus als beim Wildtyp. Mit +60 mV war das Umkehrpotential des stationären Stroms bei pH_e 6 ebenfalls positiver als das des Wildtyps. In NMG-Cl trat dieser Effekt auch auf. Beispielsweise lag das stationäre Umkehrpotential bei NMG_e/pH_e 9 bei -71 mV und war damit ca. 10 mV positiver als das von ChR2-WT unter den gleichen Bedingungen.

T159C Kinetiken

Die Kanalkinetiken nach Laserblitzanregung wurden nur, aber dafür sehr intensiv unter physiologischen Bedingungen gemessen (Abb. 3.6.6). Bei -100 mV betrug das Intervall bis zum transienten Strom 5,37 ms. Damit dauerte die vollständige Kanalöffnung fast doppelt so lang wie beim Wildtyp. Der Maximalstrom fiel mit einem τ -Wert von 19,9 ms ab, womit er um etwa 10 ms größer war als der von ChR2-WT. Im Gegensatz zum Wildtyp und H134R wies T159C eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit bei der Öffnungskinetik auf. Bei -25 mV hatte sich das

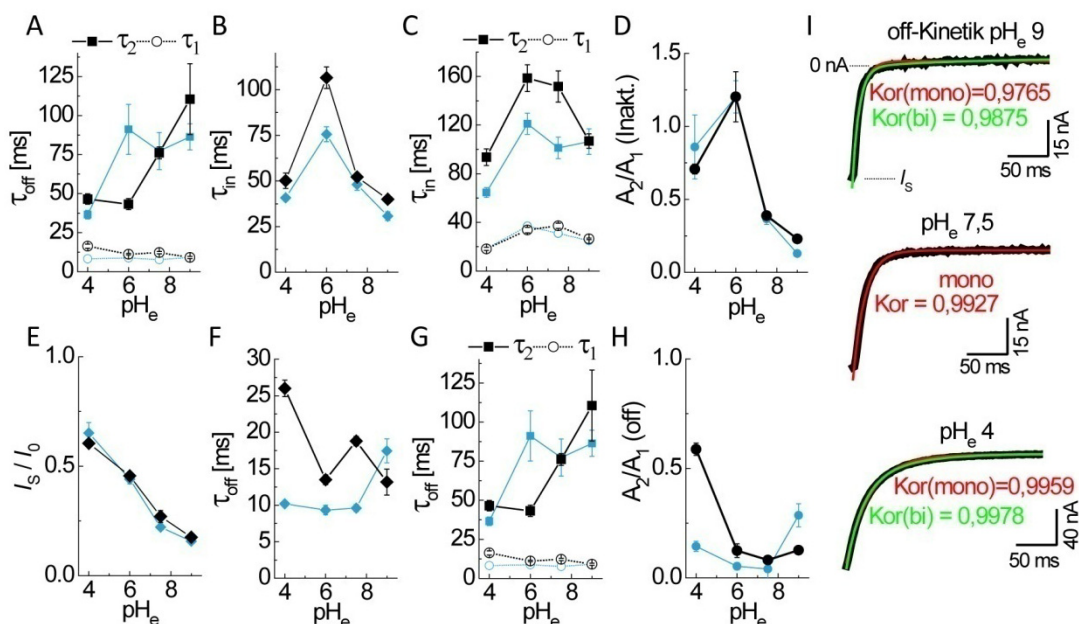


Abb. 3.6.4 pH_e-Abhängigkeit der T159C Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Die T159C Werte (schwarz) stehen im Vergleich zu ChR2-WT (blau) **A** Dauer vom Anregungsbeginn bis zum Erreichen des transienten Stroms (I_P). **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen und (**C**) biexponentiellen Fits sowie (**D**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **E** Verhältnis von I_s zu I_0 . **F** τ -Werte der *off*-Kinetik bei monoexponentiellen und (**G**) biexponentiellen Fits sowie (**H**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **I** Photoströme der *off*-Kinetik (schwarz) mit mono- (rot) und biexponentiellen Fits (grün) und den entsprechenden Korrelationskoeffizienten.

Intervall zum transienten Strom mit einer Länge von 9,6 ms gegenüber -100 mV beinahe verdoppelt, während es bei den anderen Konstrukten relativ stabil blieb. Des Weiteren hatte sich zwischen -100 mV und +50 mV der τ -Wert des *off*-Stroms bei allen Varianten ungefähr verdreifacht, wodurch auch die *off*-Kinetik von T159C hier am langsamsten war ($\tau_{off} = 70,6$ ms).

Diese Veränderungen in der Kanalkinetik traten auch bei Anregungen mit Lichtpulsen auf (Abb. 3.6.4). Hier betrug das Intervall bis zum transienten Strom unter Referenzbedingungen bereits 16,4 ms und war damit länger als bei H134R ($t_P = 14,3$ ms) und dem Wildtyp ($t_P = 12,4$ ms). Sowohl die Inaktivierung als auch der *off*-Strom ließen sich mit akzeptablen Korrelationskoeffizienten durch monoexponentielle Fits anpassen, wodurch der Vergleich zu anderen Konstrukten einfacher war. Unter neutralen Bedingungen waren beide Kinetiken vergleichsweise langsam und hatten Werte von $\tau_{in} = 52,2$ ms und $\tau_{off} = 18,9$ ms. Bei pH_e 6 war die Geschwindigkeit der Inaktivierung am langsamsten. Hier war auch der Anteil der langsamen Komponente am höchsten ($A_2/A_1 = 1,2$) und ihr τ -Wert am größten ($\tau_2 = 158$ ms). Das Verhältnis von I_s zu I_0 betrug unter Referenzbedingungen 0,27 und war damit etwas größer als beim Wildtyp ($I_s/I_0 = 0,22$) aber wesentlich kleiner als das von H134R ($I_s/I_0 = 0,44$).

Die Verlangsamung der Kanalkinetiken setzte sich bei der *Recovery* Kinetik fort, die aber nur unter neutralen Bedingungen gemessen wurde und dort einen τ -Wert von 16,4 s hatte (Abb. 3.6.1-G).

T159C Aktionsspektrum

Das Aktionsspektrum von T159C konnte aufgrund technischer Schwierigkeiten nur mit der XBO-Lampe unter der Verwendung verschiedenfarbiger Schmalbandfilter gemessen werden. Die resultierenden Spektren sind vergleichsweise grob, aber es konnte gezeigt werden, dass sie für ChR2-WT und T159C annähernd gleich sind (Abb. 3.6.1-I).

3.6.2 In vitro Optogenetik mit T159C in Hippocampusneuronen

Ein Nachteil von ChR2-WT und H134R für die Anwendung in der Neurophysiologie sind die, im Vergleich zu endogenen Natrium- und Kaliumkanälen, kleinen Stromamplituden. In vielen Fällen sind die Photoströme zu schwach, um Aktionspotentiale auszulösen. Dies führt dazu, dass man bei nichtinvasiver Anregung nicht sicher sein kann, ob in einem Neuron Aktionspotentiale ausgelöst wurden. Eine ChR2-Variante, die einen größeren Photostrom liefert, würde einen sehr wichtigen Beitrag zur Lösung dieses Problems beitragen. Ich habe daher bei einem Forschungsaufenthalt am Friedrich Miescher Institut (FMI) in Basel untersucht, ob die T159C Mutante in Neuronen ebenfalls höhere Photoströme liefert und damit für neurophysiologische Anwendungen interessant ist. Hierfür habe ich Neuronen von Rattenhippocampuskulturen mit der DNA von ChR2-WT und T159C mittels einer „Gene Gun“ transfiziert (Kap. 2.7). Die Konstrukte wurden unter der Kontrolle eines *Synapsin-1* Promotors in CA1 und CA3 Zellen exprimiert. Anschließend konnte ich mit der *Patch Clamp* Technik Photoströme und optisch ausgelöste Aktionspotentiale im *Voltage Clamp* und *Current Clamp* Modus messen. Dabei stellte sich heraus, dass T159C innerhalb einer kürzeren Expressionszeit doppelt so große Ströme wie der Wildtyp generiert (Abb. 3.6.5-D). Dadurch war es möglich, nach Anregung mit kurzen Lichtpulsen (2 ms, 470 nm) Aktionspotentiale in den Hippocampusneuronen zu generieren. Im Idealfall sollte jeder Lichtpuls ein einzelnes Aktionspotential auslösen. Bei diesen Experimenten konnten bis zu einer Frequenz von 20 Hz zuverlässig Aktionspotentiale ausgelöst werden.

Es blieb unklar, warum diese Einzelmutation größere Photoströme verursachte. Prinzipiell kommen dafür drei Mechanismen in Betracht:

1. Eine höhere Einzelkanalleitfähigkeit
2. Stärkere Expression
3. Verbesselter Transport und Einbau in die Zellmembran

Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurden die Hippocampusneuronen mit einem Fusionsprotein aus ChR2 und dem fluoreszierenden Protein RFP (*red fluorescent protein*) transfiziert. Eine höhere Expression von T159C würde sich optisch durch eine stärkere Fluoreszenz bemerkbar machen. Die Zellmembran hebt sich bei solchen Messungen oft durch eine starke Fluoreszenz vom Cytosol ab. Bei der Expression von ChR2-WT verbleibt aber ein Teil, eventuell fehlgefalteter

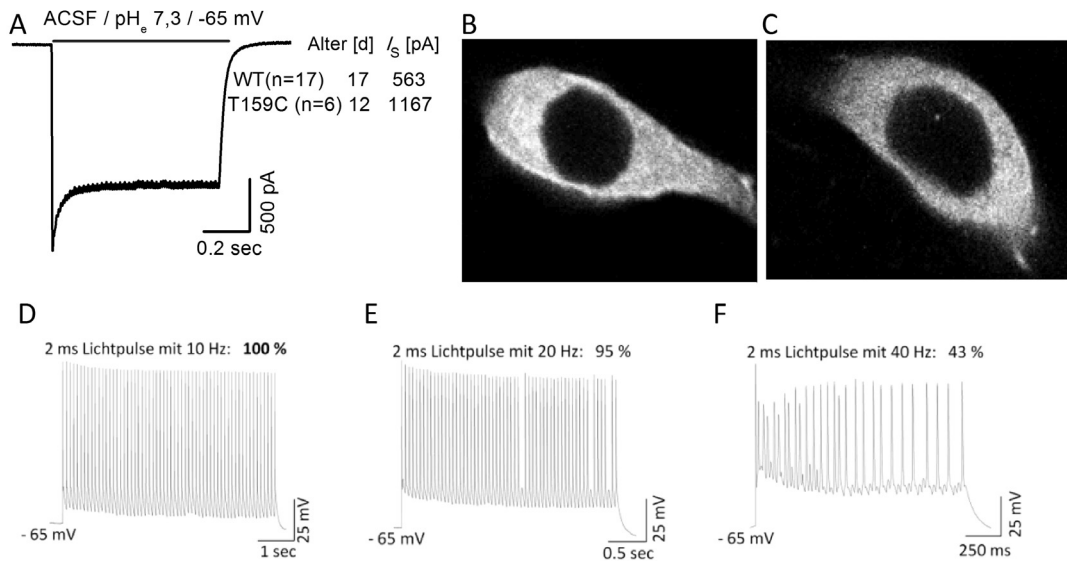


Abb. 3.6.5 T159C in vitro Messungen in Maushippocampusneuronen. **A** Typischer Photostrom eines CA3 Neurons, das T159C exprimierte sowie die Angabe der durchschnittlichen Stromamplituden von ChR2-WT und T159C jeweils 17 und 12 Tagen nach der Transfektion (Wildtypdaten aufgenommen von Philipp Schoenenberger, FMI, n: Anzahl der Proben). **B** *Two-Photon-Imaging* von CA1 Neuronen, die die Fusionsproteine T159C-RFP und **(C)** ChR2-RFP exprimierten (aufgenommen von Simon Wiegert, FMI). Beide Konstrukte zeigten eine starke cytosolische Fluoreszenz. **D** *Current clamp* Messung eines T159C exprimierenden CA1 Neurons im *whole cell* Modus. Durch die Applikation von 60 kurzen Lichtpulsen (2 ms, 470 nm) wurden Aktionspotentiale ausgelöst. Bei einer Frequenz von 10 Hz erzeugte jeder Puls ein Aktionspotential (Effizienz = 100%). **E** Anregung mit 20 Hz (95%) und **(F)** 40 Hz (43%).

Kanäle, im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und gelangt nicht in die Zellmembran. Daher tritt auch oft eine deutliche cytosolische Fluoreszenz auf. Neurophysiologen vermuten, dass ein hoher ChR2-Anteil im ER toxisch auf die Zellen wirken kann. Ein verbesserter Transport in die Zellmembran würde sich in einem größeren Verhältnis der Membranfluoreszenz zur cytosolischen Fluoreszenz zeigen. Die Fluoreszenz der ChR2-RFP Konstrukte wurde zusammen mit Simon Wiegert (FMI) mittels *Two Photon Imaging* ausgelesen, wodurch eine genaue Lokalisation innerhalb der Neuronen möglich war. Leider gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen mit ChR2-WT und T159C (Abb. 3.6.5-B+C). Für beide Konstrukte fanden sich Zellen, die eine stärkere Membran- oder ER-Fluoreszenz aufwiesen. Die Morphologie der T159C Neuronen war gegenüber den Wildtypzellen aber nicht auffällig verändert. So dass wir nicht von einer erhöhten Toxizität bei der Expression von T159C ausgehen.

3.6.3 Vergleich von ChR2-WT und H134R mit T159C Derivaten

Nach den erfolgreichen Versuchen am FMI beschlossen wir, das Potential weiterer T159C Varianten zu untersuchen. Zunächst habe ich deren biophysikalische Eigenschaften unter physiologischen Bedingungen in Oocyten charakterisiert. Vielversprechende Mutanten haben Thomas Oertner und Philipp Schoenenberger vom FMI in Basel auf ihre Leistungsfähigkeit in Neuronen untersucht. Diese Experimente werden detailliert im Diskussionsteil besprochen (Kap. 4.3.3).

Zunächst versuchte ich die Kanalkinetik von T159C durch die Kombination mit E123T und E123A zu verbessern, da wir bereits wussten, dass dies zu einer Beschleunigung der Wildtypkinetiken führte (Kap. 3.4). Eine weitere Variante stellte die Doppelmutation T159C/H134R dar, mit der versucht wurde, die größeren Photoströme von H134R durch die T159C Mutation weiter zu erhöhen. In Oocyten war dies aber nicht der Fall. Unter physiologischen Bedingungen hatte sich der stationäre Strom von H134R/T159C gegenüber H134R nicht vergrößert (Abb. 3.6.1). Die Mutationen E123T/T159C und E123A/T159C führten ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Stromamplituden gegenüber T159C. Insbesondere die Aktivität von E123A/T159C war gegenüber dem Wildtyp nur leicht vergrößert. Neben den Aktivitätsänderungen gab es auch Auswirkungen auf die Kanalkinetiken. Bei Anregung mit Lichtpulsen und unter Referenzbedingungen konnte ich bei E123A/T159C und E123T/T159C eine erhebliche Beschleunigung der *on*-Kinetiken beobachten. Zum Beispiel betrug das Intervall bis zum transienten Strom bei E123T/T159C nur 8,5 ms und lag damit fast 8 ms unter dem T159C Wert ($t_p = 16,4$ ms) und 3,8 ms unterhalb des Wildtypwertes ($t_p = 12,3$ ms) (Abb. 3.6.1-C). Beim Übergang zum stationären Strom war T159C mit einem τ -Wert von 52,2 ms am langsamsten von allen getesteten Varianten (Abb. 3.6.1-D). Durch Mutationen wurde diese Kinetik ebenfalls beschleunigt, so betrug der τ -Wert der Inaktivierung bei E123T/T159C nur noch 30 ms. Außerdem hatte der stationäre Strom bei der Doppelmutante mit $I_S/I_0 = 0,3$ einen etwas höheren Anteil verglichen mit ChR2-WT ($I_S/I_0 = 0,22$). Bei H134R/T159C war $I_S/I_0 = 0,64$ am größten (Abb. 3.6.1-F). Eine schwache Inaktivierung ist für die Anwendung zwar vorteilhaft, aber die *off*-Kinetik war von allen Konstrukten am langsamsten ($\tau_{off} = 41,6$ ms). Dagegen gab es in E123T/T159C ($\tau_{off} = 11$ ms) eine Beschleunigung gegenüber T159C ($\tau_{off} = 18,9$ ms) (Abb. 3.6.1-E).

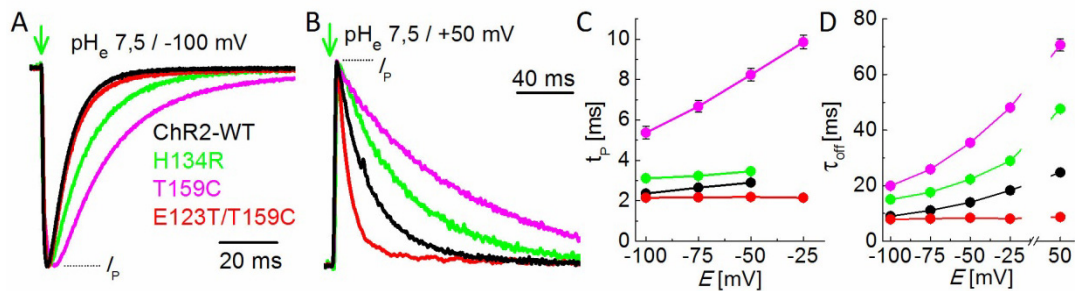


Abb. 3.6.6 Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung und Schließung von ChR2-WT, H134R, T159C und E123T/T159C. Die Aktivierung erfolgte mit Laserblitzen (Pfeile) bei 470 nm bzw. 500 nm (E123T/T159C). **A** Photoströme bei -100 mV und **(B)** $+50$ mV jeweils normiert auf den Maximalstrom (I_p). Bei -100 mV schließen ChR2-WT und E123T/T159C etwa gleich schnell. Bei $+50$ mV hat sich die Geschwindigkeit des Schließens bei allen Konstrukten verlangsamt, außer bei E123T/T159C. **C** Dauer von der Blitzlichtapplikation bis zum Erreichen des Maximalstroms (I_p) sowie **(D)** die τ -Werte der *off*-Kinetiken bei verschiedenen Spannungen. Die Öffnung und das Schließen von E123T/T159C waren unabhängig von der Membranspannung.

3.6.4 Basischarakterisierung T159C/E123T

Eine interessante Beobachtung bei der Doppelmutante E123T/T159C war, dass sich Eigenschaften der Einzelmutation E123T auch auf T159C übertragen ließen. Im vorherigen Abschnitt wurde dies bereits für die beschleunigten Kanalkinetiken gezeigt. Außerdem war die pH_e -Abhängigkeit der E123T/T159C Strom/Spannungskurven vergleichbar mit E123T (Abb. 3.6.7). Zum Beispiel überschneiden sich die I_0 -Kurven von T159C in NaCl. Dagegen waren sie bei der Doppelmutante, wie bei E123T deutlich getrennt. Bei pH_e 4/ -100 mV nahmen die I_0 und I_S Amplitude jeweils um das 2,8-fache und 4-fache gegenüber dem Referenzwerte bei pH_e 7,5 zu (E123T: 3,1-fache und 4,1-fache Zunahme). Ohne extrazelluläre Natriumionen wurde nur bei pH_e 7,5 gemessen (Abb. 3.6.1-H). In NMG-Cl reduzierte sich der stationäre Strom bei -100 mV auf 28% gegenüber NaCl. Diese Reduktion war schwach im Vergleich mit Chr2-WT ($I_S(\text{NMG})/I_S(\text{Na}) = 0,14$) und T159C ($I_S(\text{NMG})/I_S(\text{Na}) = 10\%$), lag aber im Bereich von E123T ($I_S(\text{NMG})/I_S(\text{Na}) = 26\%$).

E123T/T159C Umkehrpotentiale

Bei den Umkehrpotentialen gab es weitere Gemeinsamkeiten mit E123T. Unter physiologischen Bedingungen lag das Umkehrpotential des stationären Stroms bei -6 mV. Damit hatte es sich gegenüber T159C ($V_r = -1$ mV) um 5 mV negativ verschoben. Diese Differenz gab es auch bei E123T, deren Umkehrpotential bei -13 mV lag und sich gegenüber Chr2-WT ($V_r = -7$ mV) um 5 mV verschoben hat.

E123T/T159C Kinetiken

Nach der Aktivierung mit Laserblitzen kam es zu einer signifikanten Beschleunigung der Kanalkinetiken gegenüber T159C. Unter Referenzbedingungen betrug das Intervall zum transienten Strom 2,2 ms. Bei T159C konnte ich noch eine drastische Verlangsamung der Kanalöffnung in Richtung positiver Membranpotentiale messen (Abb. 3.6.6-C). Dagegen war die Geschwindigkeit der Kanalöffnung bei E123T/T159C unabhängig von der Spannung. Bei -25 mV hatte

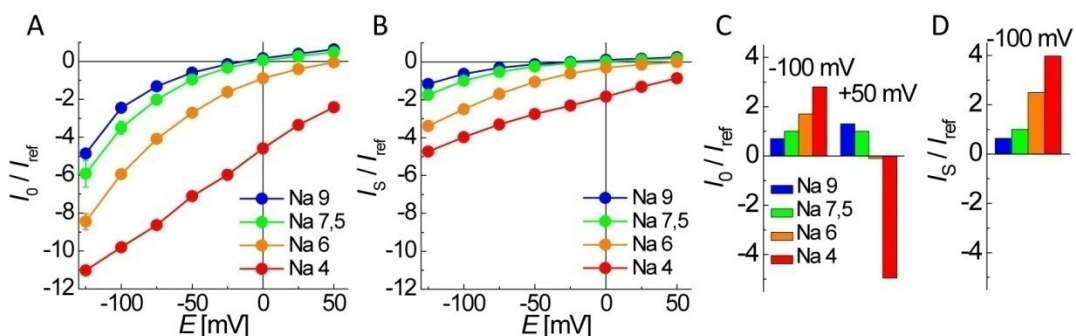


Abb. 3.6.7 E123T/T159C Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten. **A** I_0 und **(B)** I_S Amplituden in NaCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). Normierung auf I_S bei $\text{Na}_\text{e}/\text{pH}_\text{e}$ 7,5/ -100 mV. Wie bei E123T sind die I_0 Kurven klar voneinander getrennt. **C** pH_e Abhängigkeit des Einstroms (-100 mV) und des Ausstroms (+50 mV) während der Anfangsphase (I_0) und **(D)** der stationären Phase (I_S) in NaCl. Dazu wurden die Amplituden auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5 normiert.

das Öffnungsintervall ebenfalls eine Länge von 2,2 ms. Der gleiche Effekt trat beim Schließen des Kanals auf. Die *off*-Kinetiken von ChR2-WT, T159C und H134R hatten bei +50 mV einen ca. dreimal größeren τ -Wert als bei -100 mV. Dagegen gab es bei E123T/T159C nur eine leichte Zunahme zwischen -100 mV ($\tau_{\text{off}} = 7,9$ ms) und +50 mV ($\tau_{\text{off}} = 8,7$ ms) (Abb. 3.6.6-D).

Die Kinetiken bei Anregungen mit Lichtpulsen wurden für die Referenzbedingung bereits im vorherigen Abschnitt gezeigt. Hierzu muss noch ergänzt werden, dass sowohl bei der Inaktivierung als auch bei der *off*-Kinetik biexponentielle Fits zu leicht verbesserten Korrelationskoeffizienten führten. Beim Übergang zum stationären Strom hatte die langsame Komponente bei pH_e 7,5 ihren höchsten Anteil ($A_2/A_1 = 0,44$) (Abb. 3.6.7). Die langsamste Inaktivierung fand aber bei pH_e 6 statt, da hier die langsame Komponente den größten τ -Wert erreichte ($\tau_2 = 100$ ms). Die *off*-Kinetik war bei pH_e 9 am langsamsten und der Anteil der langsamen Komponente war hier am höchsten ($A_2/A_1 = 0,42$). Dieser sank stetig in Richtung saurer extrazellulärer Bedingungen und bei pH_e 4 betrug der Quotient A_2/A_1 nur noch 0,08. Dagegen blieben das Intervall bis zum transienten Strom und die schnelle Komponente der *off*-Kinetik relativ stabil gegenüber der extrazellulären Protonenkonzentration.

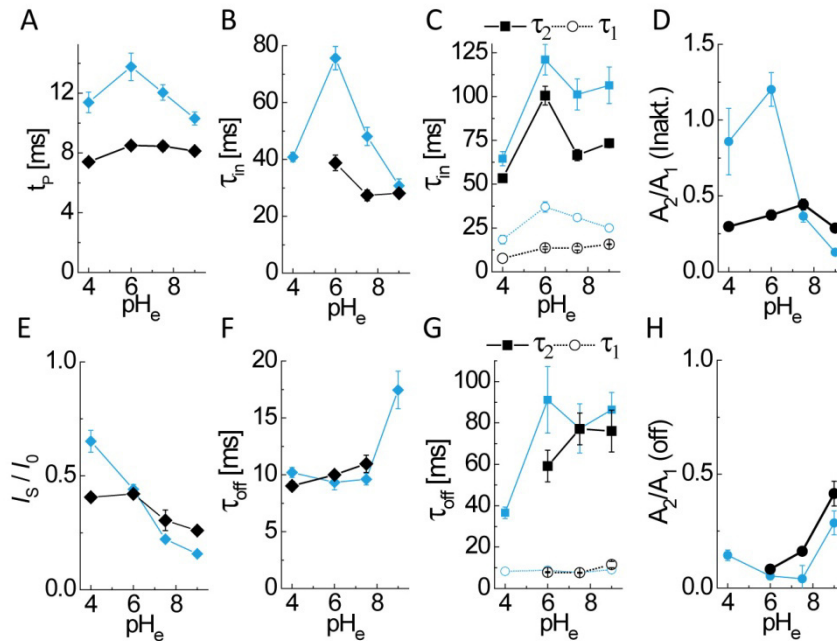


Abb. 3.6.8 pH_e-Abhängigkeit der E123T/T159C Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Die E123T/T159C Werte (schwarz) wurden mit ChR2-WT (blau) verglichen. **A** Dauer vom Anregungsbeginn bis zum Erreichen von I_p . **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen und (**C**) biexponentiellen Fits sowie (**D**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **E** Verhältnis von I_s zu I_0 . **F** τ -Werte der *off*-Kinetik mit monoexponentiellen und (**G**) biexponentiellen Fits sowie (**H**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits.

E123T/T159C Aktionsspektrum

Das Aktionsspektrum der Doppelmutante konnte nur mit der XBO-Lampe in Verbindung mit verschiedenfarbigen Schmalbandfiltern bestimmt werden (Abb. 3.6.1-I). Diese Messungen ergaben eine deutliche Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von über 30 nm auf 505 nm. Obwohl dieser Wert aufgrund der verwendeten Methode nur qualitativen Charakter hat, bestätigte sich damit, dass es in der Doppelmutante wie auch bei E123T zu einer signifikanten Rotverschiebung des Spektrums kam.

3.6.5 T159M

In BR befindet sich an der gleichen Stelle ebenfalls ein Methionin (Abb. 1.8). T159M zeigte einige ungewöhnliche und einzigartige Eigenschaften im Vergleich zu den anderen Chr2 Mutanten. Der größte Unterschied betraf die Differenz zwischen den Umkehrpotentialen von I_S und I_0 . Zunächst waren die Werte für den stationären Strom bei pH_e 9 ($V_r = -54$ mV), pH_e 7,5 ($V_r = -24$ mV) und pH_e 6 ($V_r = +24$ mV) ca. 20 mV negativer im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.6.10). Demgegenüber stand eine noch stärkere negative Verschiebung der Umkehrpotentiale von I_0 . Beispielsweise zeigten schon die Strom/Spannungsmessungen unter physiologischen Bedingungen, dass I_0 und I_S klar voneinander getrennte Nulldurchgänge haben (Abb. 3.6.10-A). Hier war die Differenz mit $\Delta E = -31$ mV am größten, während sie bei pH_e 9 und pH_e 6 jeweils -22 mV betrug (Abb. 3.6.10-C). Ein weiteres Merkmal war, dass die Differenz zwischen den I_0 und I_S Umkehrpotentialen in NMG-Cl größer wurde. Bei NMG-Cl/ pH_e 7,5 betrug sie $\Delta E = -46$ mV. Hier zeigte sich auch, dass beim Wechsel von NaCl zu NMG-Cl, die dadurch ausgelöste Verschiebung des Umkehrpotentials geringer war als bei Chr2-WT. Dies galt insbesondere für den stationären Strom.

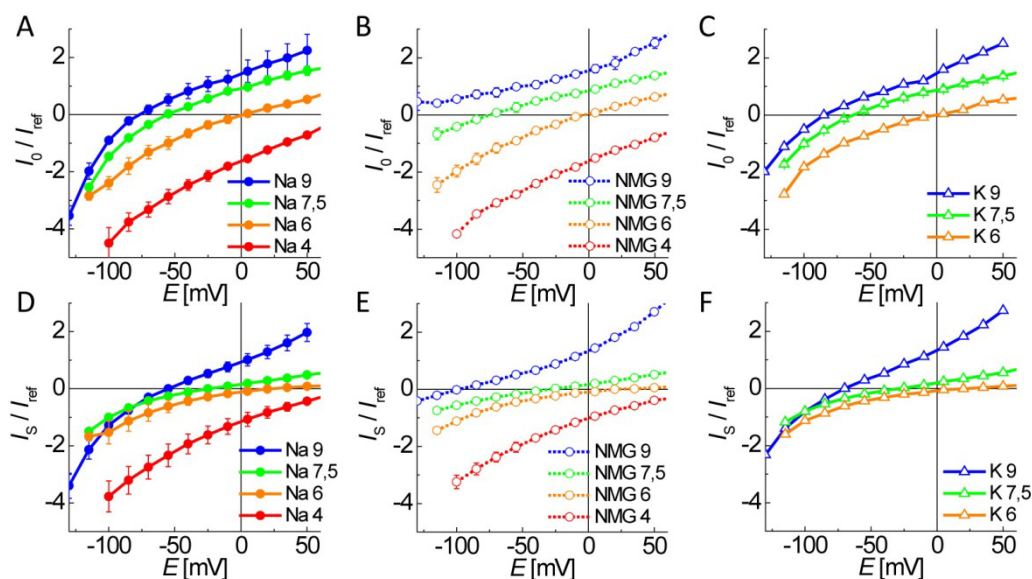


Abb. 3.6.9 T159M Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten. A I_0 Amplituden in NaCl (B) NMG-Cl und (C) KCl bei pH_e 9 (blau), 7,5 (grün), 6 (orange) und 4 (rot). D I_S Amplituden in NaCl (E) NMG-Cl und (F) KCl. Alle Amplituden wurden auf den stationären Strom bei Na_e/pH_e 7,5/ -100 mV normiert. Beim Austausch von Na^+ gegen K^+ kam es zu keiner Abnahme des Ausstroms.

Bei NMGe/ pH_e 7,5 war $V_r = -28$ mV und hatte sich damit nur um -4 mV gegenüber NaCl verschoben. Dagegen hatte sich das I_0 Umkehrpotential nach der Entfernung der extrazellulären Natriumionen deutlich von -55 mV auf -74 mV verschoben ($\Delta E = -19$ mV). Diese Beobachtungen sprechen eigentlich für einen höheren Anteil ausströmender Kaliumionen in der Anfangsphase. Denn unter den experimentellen Bedingungen kann ein negativer Beitrag zum Umkehrpotential nur von dem nach außen gerichteten Kaliumgradienten stammen. Des Weiteren gab es in NMG-Cl gegenüber NaCl eine Reduktion des Einstroms, wie anhand der Abnahme des stationären Stroms bei -100 mV deutlich wurde (Abb. 3.6.10-D). In NMG-Cl fiel die Amplitude auf 56% des Ausgangswertes und war damit vergleichsweise groß. Allerdings gab es auch hier einen Unterschied zu I_0 , da der Anfangsstrom bei NMGe/ pH_e 7,5/ -100 mV nur 28% des Ausgangswertes betrug. Um zu testen, ob bei T159M eine höhere Kaliumselektivität vorliegt, führte ich Strom/Spannungsmessungen mit 100 mM KCl im Außenmedium durch (Abb. 3.6.9-C). Dies führte, wie beim Wildtyp, zu einer Abnahme des Einstroms von Kationen unter basischen und neutralen Bedingungen sowie zur negativen Verschiebung der Umkehrpotentiale. Wenn bei T159M eine höhere Kaliumselektivität vorliegen würde, hätte der Ausstrom kleiner werden müssen. Außerdem hätte sich das Umkehrpotential in Richtung 0 mV verschoben. Beides war aber nicht der Fall. Da bei pH_e 7,5 auch keine Gradienten für Protonen vorlagen, die die starke negative Verschiebung des Umkehrpotentials hätte verursachen können, bleibt eine Erklärung dafür vorerst aus. Um die Ionenselektivität dieser Mutante zu untersuchen, bieten sich Experimente in HEK-Zellen an, da hier auch die intrazellulären Ionenkonzentrationen variiert werden können.

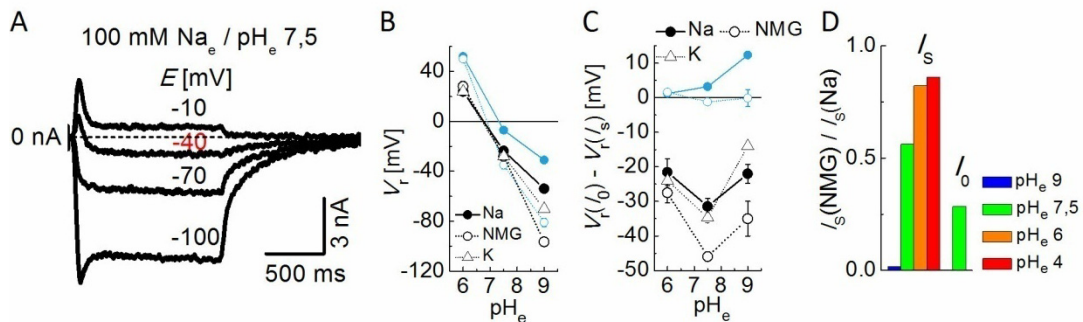


Abb. 3.6.10 Umkehrpotentiale von T159M und Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl. **A** Photoströme von T159M bei Na_e/ pH_e 7,5 und vier Membranspannungen. I_0 und I_s haben klar erkennbar unterschiedliche Nulldurchgänge. **B** Umkehrpotentiale des stationären Stroms von T159M (schwarz) in NaCl, NMG-Cl und KCl bei drei pH_e-Werten im Vergleich zu Chr2-WT (blau). Gegenüber dem Wildtyp waren die Umkehrpotentiale deutlich negativ verschoben. Der Austausch von Na⁺ gegen K⁺ führte nicht zu einer positiven Verschiebung von V_r . **C** Differenzen zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_s . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ negativer als $V_r(I_s)$. Bei allen pH_e-Werten war das Umkehrpotential von I_0 deutlich negativer als das von I_s . **D** Verhältnis von I_s in NMG-Cl zu I_s in NaCl bei -100 mV, bei vier pH_e-Werten und von I_0 bei pH_e 7,5. Der Anteil von Protonen am I_s -Einstrom war bei pH_e 7,5 relativ hoch. Bei I_0 war der Anteil geringer.

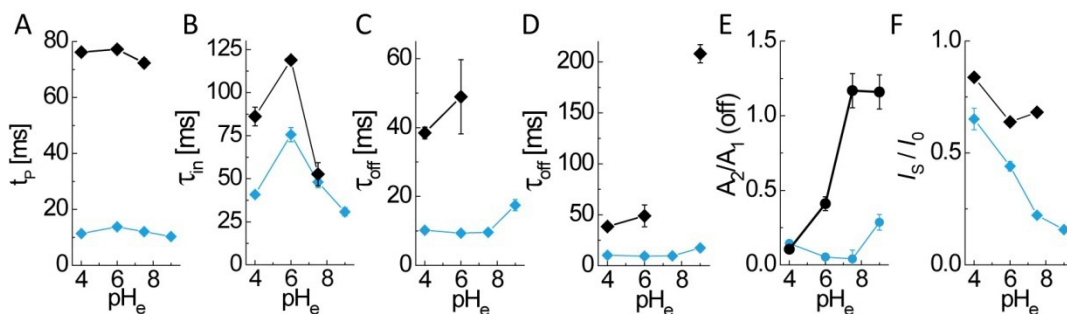


Abb. 3.6.11 pH_e -Abhängigkeit der T159M Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Die T159M Werte (schwarz) stehen im Vergleich zu ChR2-WT (blau). **A** Dauer vom Anregungsbeginn bis I_p . **B** τ -Werte der Inaktivierung bei monoexponentiellen Fits. **C** τ -Werte der *off*-Kinetik bei monoexponentiellen und (**D**) biexponentiellen Fits sowie (**E**) das Verhältnis der Amplituden von langsamer (A_2) und schneller (A_1) Komponente bei biexponentiellen Fits. **F** Verhältnis von I_s zu I_0 .

3.7 Step-function opsins: C128 und D156 Mutationen

Step-function opsins (SFO) ist die Bezeichnung für Channelrhodopsinvarianten, die durch verschiedene Wellenlängen jeweils aktiviert und deaktiviert werden können. Zu dieser Gruppe gehören Einzelmutationen an den Positionen Cystein 128 und Aspartat 156. In Bakteriorhodopsin befindet sich statt des Cysteins, Threonin 90 an der gleichen Position. Es ist Teil der Retinalbindungstasche (Abb. 1.8) und interagiert mit dem Retinal über sterische Wechselwirkungen [14,56]. Zudem steht BR-T90 über eine Wasserstoffbrückenbindung mit BR-D115 in Kontakt. Dieser Rest ist als D156 in ChR2 konserviert. FTIR Studien von ChR2 lassen darauf schließen, dass auch zwischen C128S und D156 eine Wasserstoffbrückenbindung besteht [57].

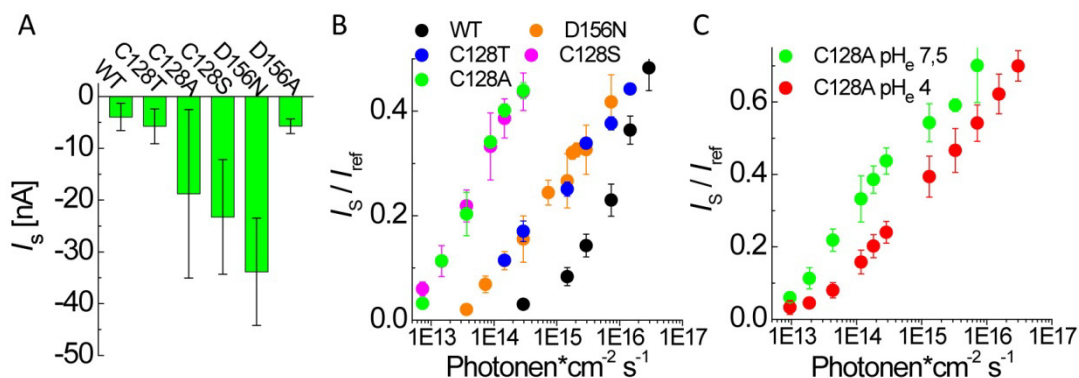


Abb. 3.7.1 Vergleich der Amplituden und der Lichtabhängigkeit von SFO-Varianten mit ChR2-WT. **A** Durchschnitt aller gemessenen I_s Amplituden bei Na_e pH_e 7,5/ -50 mV. **B** I_s Amplituden bei verschiedenen Lichtintensitäten nach Normierung auf den Wert bei 100% Intensität (I_{ref}). Die Anregung erfolgte mit 450 nm bei pH_e 7,5. Die SFO Varianten zeigten bei geringen Lichtintensitäten verhältnismäßig größere Aktivitäten als der Wildtyp. **C** Vergleich der C128A Lichtsensitivität bei pH_e 7,5 (grün) und pH_e 4 (rot). Die Beschleunigung des Schließvorgangs bei pH_e 4 bewirkt eine Verringerung der Lichtsensitivität.

3.7.1 C128T

Mutationen an dieser Position hatten dramatische Effekte auf die Kanalkinetiken. Unter Referenzbedingungen und Anregung mit Lichtpulsen zeigte der Photostrom von C128T die typischen Eigenschaften mit transientser und stationärer Phase, wobei aber zum Beispiel die Inaktivierung langsamer war als beim Wildtyp (Abb. 3.7.2). Daher dauerten die Messungen bei den SFO Varianten in der Regel länger. Um dabei die Belastung für die Oocyten möglichst gering zu halten, wurden die Daten bei einer Spannung von -50 mV aufgezeichnet und mit den entsprechenden Wildtypwerten verglichen. Die absolute Amplitude des stationären Stroms von C128T war gegenüber ChR2 etwas erhöht (Abb. 3.7.1). Die *IV*-Kurven zeigen nur eine schwache pH_e -Abhängigkeit des Einstroms gegenüber der extrazellulären Protonenkonzentration (Abb. 3.7.3). Zum Beispiel war die I_0 Amplitude bei pH_e 4/-100 mV gegenüber pH_e 7,5 gerade 1,9-mal größer.

Das Umkehrpotential des stationären Stroms betrug unter neutralen Bedingungen -12 mV und verschob sich auf jeweils -35 mV und +48 mV bei pH_e 9 und pH_e 6. Diese Werte entsprachen weitgehend den Beobachtungen beim Wildtyp. Damit hatte die Mutation kaum einen Einfluss auf die Ionenselektivität des Kanals.

C128T Kinetiken

Große Differenzen gab es aber hinsichtlich der Photostromkinetiken. Beispielsweise betrug das Intervall bis zum transienten Strom nach Beginn einer Anregung mit Lichtpulsen durchschnittlich 392 ms unter neutralen Bedingungen (Tab. 3.8.19). I_p fiel mit einem τ -Wert von 4,9 s auf den stationären Strom ab. Bei pH_e 7,5 war die *off*-Kinetik nach Lichtabschaltung biexponentiell. Die langsame und schnelle Komponente hatte einen τ -Wert von jeweils 6,8 s und 1,3 s. Das Verhältnis A_2/A_1 lag bei 0,55. Die monoexponentielle Anpassung der *off*-Ströme ergab aber nur einen geringfügig schlechteren Korrelationskoeffizienten und wurde verwendet, um die SFO Varianten besser miteinander vergleichen zu können. Hierbei hatte die C128T *off*-Kinetik einen τ -Wert von 2,1 s. Tendenziell beschleunigte sich das Schließen unter sauren Bedingungen und erreichte bei pH_e 4/-50 mV einen τ -Wert von 837 ms.

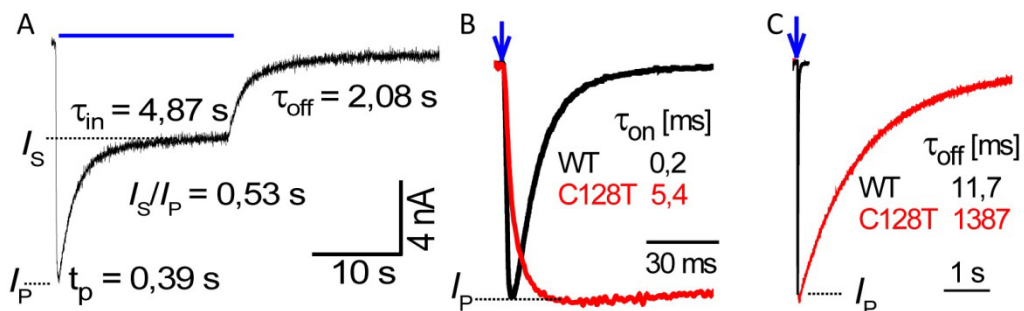


Abb. 3.7.2 C128T Photoströme und Kinetiken bei pH_e 7,5. **A** Die Anregung erfolgte mit einem Lichtpuls für 20 s (450 nm, blauer Balken) bei -50 mV (t_p : Dauer vom Anregungsbeginn zu I_p , τ_{in} : τ -Wert des Übergangs von I_p zu I_S , I_S/I_P : Verhältnis von stationärem Strom zu transientem Strom, τ_{off} : τ -Wert der *off*-Kinetik). **B**, **C** Anregung mit Laserblitzen (Pfeil, 470 nm, 10 ns). Die C128T-Spuren (rot) mit den τ -Werten für *on*- und *off*-Kinetik wurden mit ChR2-WT (schwarz) verglichen. Die Ströme wurden bei -75 mV aufgenommen und auf den jeweiligen Maximalwert (I_p) normiert. Die Kanalöffnung und insbesondere das Schließen des Kanals waren bei C128T signifikant verzögert.

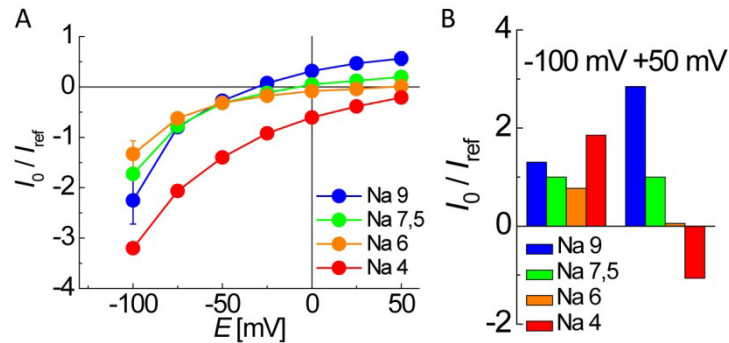


Abb. 3.7.3 C128T Strom/Spannungskurven. **A** C128T I_0 Stromamplituden in NaCl bei verschiedenen pH_e -Werten, normiert auf I_s bei Na 7,5/ -100 mV. **B** pH_e -Abhängigkeit von I_0 bei -100 mV und +50 mV mit Normierung auf den jeweiligen Wert bei pH_e 7,5.

Dies konnte bei Messungen mit Laserblitzaktivierung bestätigt werden (Abb. 3.7.2-B/C). Die Kanalöffnung war so langsam, dass die kapazitiven Ströme nur einen Teil der *on*-Kinetik unmittelbar am Anfang überlagerten. Deshalb konnte der τ -Wert der *on*-Kinetik mittels monoexponentieller Fits bestimmt werden. Bei pH_e 7,5/ -75 mV lag er bei 5,4 ms und wurde bei pH_e 4 deutlich kleiner (2,2 ms). Das galt auch für die *off*-Kinetik, deren τ -Wert bei pH_e 7,5/ -75 mV und pH_e 4 jeweils 1,4 s und 0,61 s betrug. Damit war beispielsweise die *off*-Kinetik unter physiologischen Bedingungen ca. 100-mal langsamer als beim Wildtyp. Dagegen war die *Recovery* Kinetik, die nur in einer Einzelmessung bestimmt werden konnte, vergleichsweise schnell. Ihr τ -Wert betrug bei pH_e 7,5/ -75 mV ca. 30,1 s (Abb. 3.7.5-B).

Photochemische Beschleunigung der *off*-Kinetik von C128T

Eine Gemeinsamkeit aller *step-function opsins* ist die Eigenschaft, dass das Schließen der Pore durch Lichtapplikation während der *off*-Phase beschleunigt wird. Dies ist in Abb. 3.7.3 verdeutlicht. C128T wurde mit 450 nm aktiviert und während der langen *off*-Phase zusätzlich mit blau- oder rotverschobenem Licht angeregt. Dadurch nahm die Geschwindigkeit der *off*-Kinetik zu. Dabei gab es zwei Effekte, die von der Wellenlänge des Deaktivierungslichtes abhingen. Je weiter sie von der Aktivierungswellenlänge entfernt war, umso langsamer wurde der

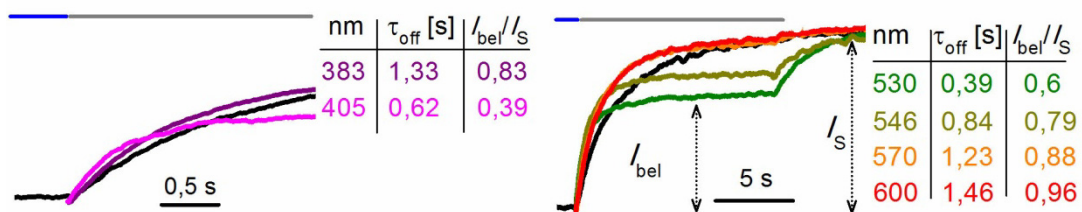


Abb. 3.7.4 Photochemische Beschleunigung der *off*-Kinetik von C128T. Nach Anregung mit 450 nm (blauer Balken) erfolgte in der *off*-Phase für 10 s (grauer Balken) die Applikation von Licht verschiedener Wellenlängen, wodurch das Schließen des Kanals beschleunigt wurde (τ_{off} , Tabelle). Die Farbe der Stromspur symbolisiert die Wellenlänge des Deaktivierungslichtes (nm, Tabelle). Zum Vergleich wurde die Stromspur im Dunkeln abgebildet (schwarz). Mit zusätzlichem Licht schloss C128T teilweise nicht vollständig, was über das Verhältnis des Reststroms zum stationären Strom angegeben wird (I_{bel}/I_s).

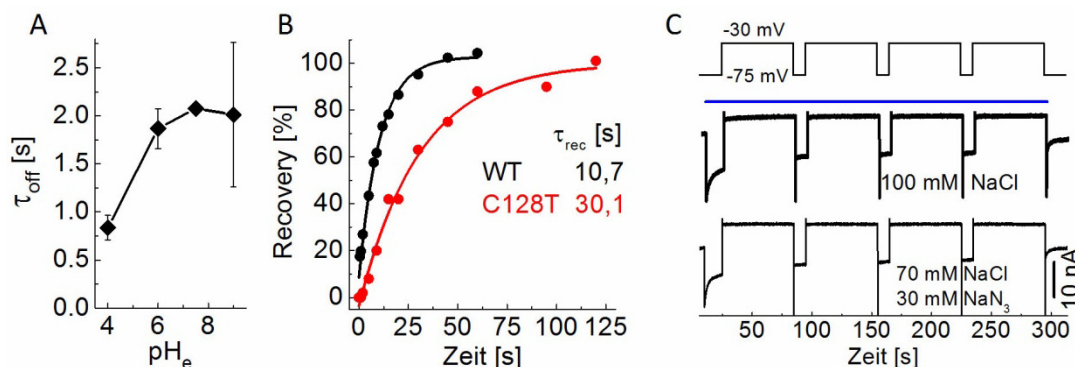


Abb. 3.7.5 Kinetische Parameter von C128T und der Einfluss von NaN_3 . **A** pH_e -Abhängigkeit der *off*-Kinetik bei -50 mV nach Anregung mit Lichtpulsen. **B** *Recovery* Kinetik von C128T (rot) bei pH_e 7,5/ -75 mV im Vergleich zu ChR2-WT (rot). Im Vergleich zu den anderen Kanalkinetiken fiel die Verlangsamung der *Recovery* Kinetik moderat aus. **C** Photoströme von C128T unter anhaltender Belichtung (blau) bei pH_e 7,5 in NaCl (oben) und mit 30 mM NaN_3 (unten). Um die Belastung für die Zellen gering zu halten, wurden während der Belichtungsphase nur für kurze Zeiträume bei -75 mV gemessen. Die Kinetiken hatten sich unter dem Einfluss von NaN_3 nicht verändert.

Schließvorgang und umso deutlicher ging der Photostrom auf null zurück. Im Vergleich zu den Mutanten C128S und C128A, die weiter unten besprochen werden, war die photochemische Beschleunigung der *off*-Kinetik von C128T schwach. Das lag vermutlich an der kürzeren Lebenszeit des leitenden Zustands von C128T.

In Doppelpulsmessungen konnte weder blau- noch rotverschobenes Licht die Erholung des transienten Stroms beschleunigen. Tatsächlich inhibierte zusätzliches Licht während der *off*-Phase die *Recovery* Kinetik, da der zweite transiente Strom nach zusätzlicher Belichtung wesentlich kleiner war als nach einer Dunkelphase (Abb. 3.7.5-B). Daher führte die photochemische Umwandlung des leitenden Zustands nicht unmittelbar zurück in den Grundzustand. In einem weiteren Versuch habe ich Messungen mit 30 mM Natriumazid in der Außenlösung durchgeführt, wodurch die Kanalkinetik aber nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.7.5-C).

Aufgrund der langsamen *off*-Kinetik waren die SFO Varianten deutlich lichtempfindlicher als der Wildtyp. Unter abnehmender Lichtintensität wurden die Stromamplituden kleiner (Abb. 3.7.1). Die stationären Ströme von ChR2-WT betrugen bei einer Intensität von $1 \cdot 10^{16}$ Photonen/cm²·s noch 20% ihrer Ausgangsgröße bei 100% Lichtintensität ($3 \cdot 10^{17}$ Photonen/cm²·s). Die C128T Aktivität nahm dagegen erst bei einer Intensität von $1 \cdot 10^{15}$ Photonen/cm²·s auf 20% ihres Ausgangswertes ab. Somit war C128T ca. 10-mal lichtsensitiver als der Wildtyp, aber nicht 100-mal wie aus der *off*-Kinetik vermutet werden könnte. Das liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der gleichzeitigen Beschleunigung der *off*-Kinetik während einer Anregung. Vermutlich überlappen sich Anregungs- und Deaktivierungsspektrum, so dass bei der Aktivierung ein Teil der Moleküle sofort wieder photochemisch deaktiviert werden. Die höhere Lichtsensitivität der SFO Varianten machte sich zudem erst im photostationären Gleichgewicht bemerkbar. Wegen der langsameren *off*-Kinetik konnten sich auch bei niedrigen Lichtintensitäten nach und nach aktive Kanäle akkumulieren. Allerdings dauerte es

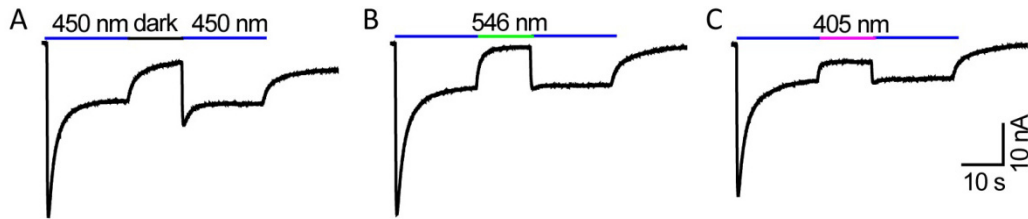


Abb. 3.7.6 C128T Photoströme in Doppelexperimenten. (pH_e 7,5/ -75 mV) Während der 15 s Pause zwischen den Anregungspulsen (blau, 450 nm) wurde **A** kein Licht appliziert (schwarzer Balken), **B** 546 nm (grün) oder **C** 405 nm Licht (magenta) eingestrahlt. Die photochemische Beschleunigung der *off*-Kinetik führte nicht zur Beschleunigung der *Recovery* Kinetik.

bei abnehmenden Intensitäten immer länger bis der stationäre Zustand erreicht wurde, da weniger Kanäle pro Zeitintervall aktiviert wurden.

3.7.2 C128A

Die Substitution von C128 gegen Alanin führte zu noch langsameren Kanalkinetiken im Vergleich zu C128T. Der stationäre Strom war gegenüber C128T und dem Wildtyp aber signifikant größer (Abb. 3.7.1). Unter Referenzbedingungen betrug das Intervall bis zum transienten Strom ca. 853 ms (Tab. 3.8.19). Bei den Messungen fiel auf, dass nach mehrfacher Anregung die Stromamplituden von C128A immer kleiner wurden und insbesondere der transiente Strom verschwand. Nach mehreren Anläufen konnte mittels einer Einzelmessung einer erstmalig belichteten, also dunkeladaptierten Zelle nachgewiesen werden, dass C128A eine extrem langsame Inaktivierung hat (Abb. 3.7.7-B). Ihr τ -Wert betrug bei pH_e 7,5/ -50 mV etwa 421 s. Die *off*-Kinetik war wie bei C128T biexponentiell ($\tau_1 = 55,9$ s; $\tau_2 = 5,1$ s). Im Vergleich zum Wildtyp

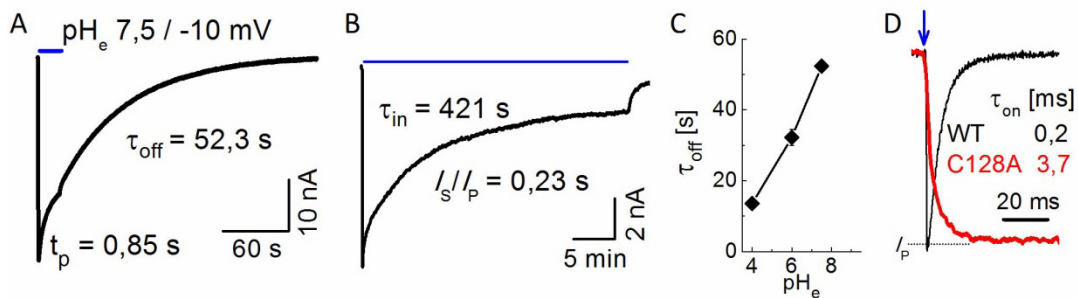


Abb. 3.7.7 C128A Photoströme und Kinetiken unter physiologischen Bedingungen. (pH_e 7,5) **A** Typischer Photostrom einer erstmalig belichteten Zelle während und nach Anregung mit 450 nm (blauer Balken, 20 s). Angegeben wurden die durchschnittliche Dauer (t_p) vom Anregungsbeginn bis zum Erreichen des transienten Stroms (I_p) sowie der τ -Wert der *off*-Kinetik (-50 mV). **B** Erste Belichtung einer Probe mit einem anhaltenden Lichtpuls (450 nm) für 30 min. Die Angaben für den τ -Wert der Inaktivierung (τ_{in}) und das Verhältnis von I_s zu I_0 beziehen sich auf diese Einzelmessung bei -50 mV. **C** pH_e -Abhängigkeit der *off*-Kinetik nach Anregung mit Lichtpulsen bei -50 mV. Der Kanal schließt unter sauren Bedingungen schneller. **D** C128A Photostrom (rot) nach einer Laserblitzaktivierung (Pfeil, 470 nm, 10 ns) bei pH_e 7,5/ -75 mV sowie der τ -Wert der *on*-Kinetik im Vergleich zu ChR2-WT (schwarz). Die Ströme wurden jeweils auf den Maximalstrom (I_p) normiert.

hatte die langsamere Komponente einen viel höheren Anteil ($A_2/A_1 = 7$). Monoexponentielle Fits hatten nur geringfügig schlechtere Korrelationskoeffizienten. Der τ -Wert lag unter physiologischen Bedingungen bei 52,3 s und nahm unter sauren Bedingungen ab. Bei pH_e 4 lag er bereits bei 13,6 s (Tab. 3.8.22).

Die Kanalöffnung nach Laserblitzaktivierung hatte unter physiologischen Bedingungen einen τ -Wert von 3,1 ms (-75 mV) (Abb. 3.7.7-D). Damit verlief sie sogar etwas schneller als bei C128T. Dagegen verlief das Schließen des Kanals deutlich langsamer und erreichte einen τ -Wert von 30,9 s. Unter sauren Bedingungen gab es hier eine signifikante Beschleunigung und der τ -Wert betrug bei pH_e 4/-75 mV nur noch ca. 7,1 s.

Die langsame *off*-Kinetik konnte durch Lichtapplikation während der *off*-Phase deutlich beschleunigt werden (Abb. 3.7.8). Die Geschwindigkeit hing davon ab, wie weit das Deaktivierungslicht gegenüber der ursprünglichen Anregungswellenlänge verschoben war. Dadurch war es möglich, C128A durch Licht verschiedener Wellenlängen abwechselnd zu aktivieren und zu deaktivieren. Die Lichtsensitivität war gegenüber C128T weiter signifikant erhöht (Abb. 3.7.1). Bei pH_e 7,5 genügte eine Intensität von $4 \cdot 10^{13}$ Photonen/ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}$, um 20% der Ausgangsaktivität bei 100prozentiger Lichtintensität hervorzurufen. Damit war C128A gegenüber dem Wildtyp ungefähr 250-mal lichtempfindlicher. Hier konnte auch der unmittelbare Zusammenhang zwischen der *off*-Kinetik und der Lichtsensitivität gezeigt werden. Das Schließen des Kanals war bei pH_e 4 signifikant schneller und der τ -Wert der *off*-Kinetik war hier etwa 4- bis 5-mal

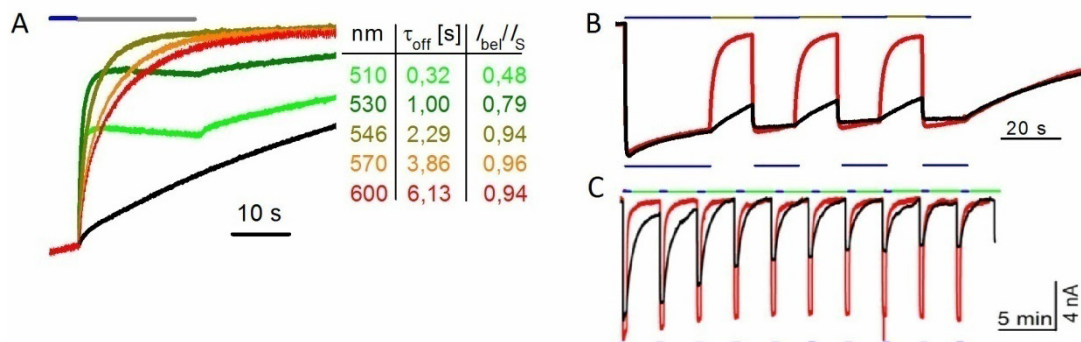


Abb. 3.7.8 Photochemische Beschleunigung der *off*-Kinetik von C128A. (pH_e 7,5/-50 mV) **A** Nach Anregung mit 450 nm (blau) wurden während der *off*-Phase verschiedene Wellenlängen appliziert (20 s, grauer Balken). Die Farbe der Stromspur symbolisiert die Wellenlänge des Deaktivierungslichts (nm, vgl. Tabelle). Zum Vergleich wurde die Stromspur im Dunkeln abgebildet (schwarz). Mit zusätzlichem Licht schloss C128A schneller aber teilweise nicht vollständig, was über das Verhältnis des Reststroms zum stationären Strom angegeben wird (I_{de}/I_s). **B** C128A Photostrom (schwarz) unter alternierenden Aktivierungspulsen (450 nm, blaue Balken) ohne Deaktivierungslicht. Bei zusätzlicher Anregung mit 546 nm (gelbe Balken) zwischen den Aktivierungsphasen, beschleunigte sich die *off*-Kinetik des Photostroms. So konnte der Kanal abwechselnd geöffnet und geschlossen werden. **C** C128A Photoströme von Zellen, die erstmalig belichtet wurden. Bei der schwarzen Spur wurden nur Anregungspulse appliziert (450 nm, blau). Bei der roten Spur wurde zwischen den Aktivierungsphasen Licht mit 530 nm (grüne Balken) appliziert. Die Inaktivierung des Kanals konnte so verhindert werden.

kleiner als bei pH_e 7,5 (Tab 3.8.22). Dadurch nahm auch die Lichtempfindlichkeit ab. Eine Abnahme der Aktivität auf 20% gegenüber 100% Lichtintensität wird bei pH_e 4 schon bei $2 \cdot 10^{14}$ Photonen/ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}$ erreicht. Damit ist C128A bei pH_e 7,5 ca. 5-mal lichtempfindlicher als bei pH_e 4. Wie bei C128T bezieht sich die Lichtsensitivität auf die Aktivität im photostationären Gleichgewicht. Bei abnehmenden Intensitäten wurden weniger Kanäle pro Zeitintervall aktiviert. Der offene Zustand akkumulierte aufgrund seiner längeren Lebenszeit auch bei schwachen Lichtverhältnissen, aber es dauerte länger bis der Maximalwert erreicht wurde.

In Versuchen, bei denen dunkeladaptiertes C128A wiederholt mit blauem Licht angeregt wurde, kam es zu einer stetigen Abnahme der Stromamplituden (Abb. 3.7.8-C), die auf die langsame Inaktivierung des Kanals zurückgeht. Allerdings ließ sich dieser Prozess abschwächen, wenn während der *off*-Phase rotverschobenes Licht appliziert wurde. Damit war es zum einen möglich das Schließen des Kanals zu beschleunigen und zum anderen gab es keine signifikante Abnahme der Stromamplituden bei der folgenden Aktivierung. Offensichtlich verhindert die photochemische Beschleunigung der *off*-Kinetik die Inaktivierung des Kanals.

Eine ausführliche Diskussion zu diesem Effekt findet in Kap. 4.2.6 statt.

3.7.3 C128S

Bei Anregung mit Lichtpulsen verlief die Aktivierung von C128S so langsam, dass oft kein transienter Strom zu erkennen war. Stattdessen gab es häufig einen sehr langsamen Anstieg zum stationären Strom, der erst nach ca. 3 s vollständig erreicht wurde. Bei einigen Messungen mit dunkeladaptierten Zellen gab es einen schwachen transienten Strom, der nach ca. 1,3 s das Maximum erreichte und sehr langsam abfiel. Die Stromamplitude lichtadaptierter Zellen betrug bei pH_e 7,5/ -50 mV im Durchschnitt -23 nA (Abb. 3.7.1). Das Schließen des Kanals verlief gegenüber C128A noch einmal deutlich langsamer (Abb. 3.7.9). Hier ergaben die monoexponentiellen Fits einen τ -Wert von 105 s unter neutralen Bedingungen und 27 s bei pH_e 4. Rotverschobenes Licht beschleunigte die *off*-Kinetik drastisch. (Abb. 3.7.10). Dadurch war es möglich C128S mit blauem Licht zu öffnen und durch eine anschließende Applikation von rotverschobenen Wellenlängen wieder zu schließen.

Nach Anregung mit Laserblitzen unter neutralen Bedingungen und bei negativen Spannungen trat ein transienter Nettoausstrom auf, der langsam in eine negative Amplitude überging (Abb. 3.7.9-C). Die Kanalöffnung hatte bei pH_e 7,5/ -75 mV und pH_e 4 jeweils einen τ -Wert von 25,7 ms und 2,9 ms.

Nach dem Ende einer anhaltenden Lichtapplikation entstand ein zweiter transienter Strom (I_{2p}) (Abb. 3.7.11). Die Amplitude dieses Stroms entsprach bei unterschiedlichen Membranspannungen immer der Stromrichtung des stationären Stroms. Daher repräsentiert I_{2p} vermutlich eine transiente Zunahme des leitenden Zustands. Das Verhältnis von I_{2p} zu I_s veränderte sich bei unterschiedlichen pH_e -Werten. Bei pH_e 4 betrug der Quotient gerade 0,02, während er bei pH_e 9 auf 0,31

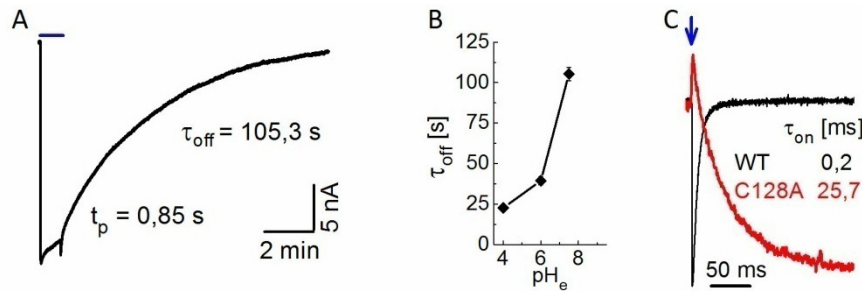


Abb. 3.7.9 C128S Photoströme und Kinetiken unter physiologischen Bedingungen. (pH_e 7,5) **A** Typischer Photostrom einer erstmalig belichteten Zelle nach Anregung mit 450 nm (blauer Balken, 50 s). Dargestellt wurden die durchschnittliche Dauer (t_p) vom Anregungsbeginn bis zum transienten Strom und der τ -Wert der off -Kinetik (-50 mV). **B** pH_e -Abhängigkeit der off -Kinetik nach Anregung mit Lichtpulsen bei -50 mV. **C** C128S Photostrom (rot) nach Laserblitzaktivierung (Pfeil, 470 nm, 10 ns) bei pH_e 7,5/-75 mV und τ -Wert der on -Kinetik im Vergleich zu ChR2-WT (schwarz). Die Ströme wurden jeweils auf den Maximalstrom (I_p) normiert. Unmittelbar nach der Aktivierung war der C128S Photostrom kurzzeitig positiv und der normalen Stromrichtung unter diesen Bedingungen entgegengesetzt.

anwuchs. Die I_{2p} Amplitude zeigte auch eine Abhängigkeit gegenüber der Anregungswellenlänge. Wenn beispielsweise C128S mit 450 nm und 500 nm aktiviert wurde, veränderte sich das Verhältnis von I_{2p} zu I_s nicht, obwohl sich die absoluten Amplituden unterschieden. Allerdings sank der Quotient nach Anregung mit 400 nm auf 0,09 ab. Eine detaillierte Diskussion zu diesem Effekt findet in Kap. 4.2.6 statt.

Die Lichtsensitivität entsprach der von C128A. Damit war C128S ca. 250-mal lichtempfindlicher als ChR2-WT. Die off -Kinetik von C128S war aber doppelt so langsam wie die von C128A. Trotzdem hatte die Lichtsensitivität von C128S nicht weiter zugenommen. Vermutlich überlappen sich Anregungs- und Deaktivierungsspektrum, so dass während der Anregung auch immer Kanäle photochemisch deaktiviert werden. Daher korrelierte die Lichtempfindlichkeit nicht direkt mit der off -Kinetik, sondern war kleiner. Bei C128S muss dieser Effekt ausgeprägter sein als bei C128A, wodurch bei der Anregung verhältnismäßig mehr Kanäle wieder deaktiviert wurden.

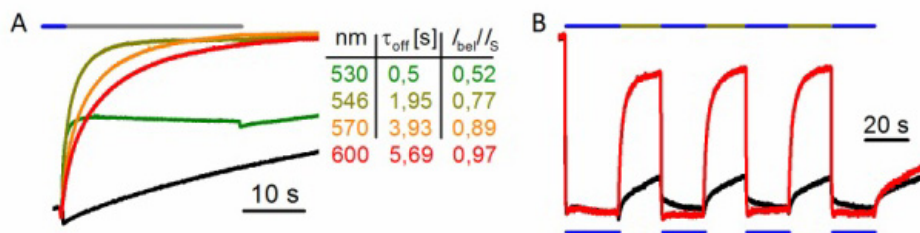


Abb. 3.7.10 Photochemische Beschleunigung der off -Kinetik von C128S. (pH_e 7,5/-50 mV) **A** Nach Anregung mit 450 nm (blau) wurden während der off -Phase verschiedene Wellenlängen appliziert (30 s, grauer Balken). Die Farbe der Stromspur symbolisiert die Wellenlänge des Deaktivierungslichts (nm, Tabelle). Zum Vergleich wurde die Stromspur im Dunkeln abgebildet (schwarz). Mit zusätzlichem Licht schloss C128S schneller aber teilweise nicht vollständig, was über das Verhältnis des Reststroms zum stationären Strom angegeben wird (I_{bel}/I_s). **B** Bei der schwarzen Spur wurden nur angeregt (450 nm, blaue Balken). Bei der roten Spur wurden abwechselnd 450 nm und 546 nm Pulse (gelbe Balken) appliziert. Der Kanal konnte so abwechselnd geöffnet und geschlossen werden.

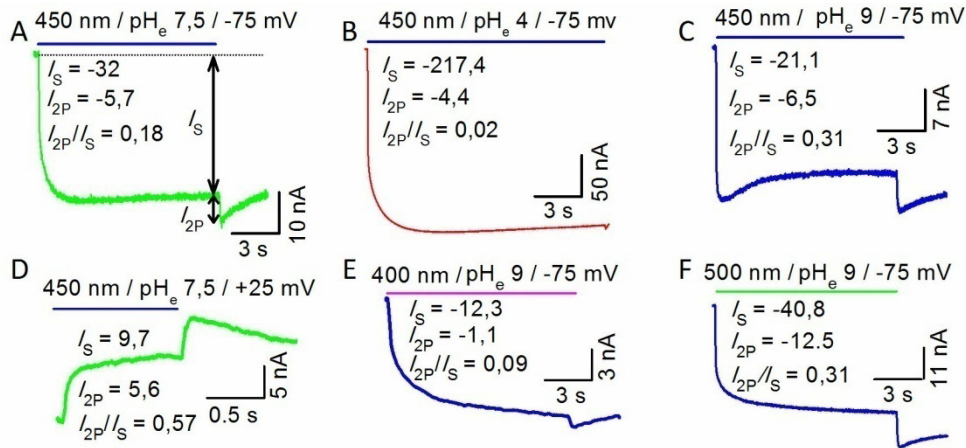


Abb. 3.7.11 C128S pH_e- und Wellenlängenabhängigkeit von I_{2P} . Nach dem Ende eines Anregungspulses nahm die Kanalaktivität zunächst sprunghaft zu und ging dann langsam auf null zurück. **A** Photostrom nach Anregung mit 450 nm (blauer Balken) bei -75 mV, pH_e 7,5, **B** pH_e 4 und **C** pH_e 9. Der zweite Peak-Strom (I_{2P}) wurde als Differenz zum stationären Strom (I_S) ausgelesen. Das Verhältnis von I_{2P} zu I_S nahm mit sinkendem pH_e ab. **D** C128S Photostrom bei pH_e 7,5/ +25 mV. Die Stromrichtung von I_{2P} entsprach der Richtung von I_S . **E** Anregung mit 400 nm (magenta) und **F** 500 nm (grün) bei pH_e 9. Bei 400 nm ist das Verhältnis I_{2P}/I_S kleiner. Die Angabe der Stromamplituden erfolgte in Nanoampere.

3.7.4 D156N

Diese Mutation bewirkte ebenfalls eine signifikante Verlangsamung der Kanalkinetiken. D156N zeigte von allen SFO Varianten die größten Photoströme, die unter Referenzbedingungen durchschnittlich -34 nA erreichten (Abb. 3.7.1). Die Lichtempfindlichkeit war in etwa vergleichbar mit der von C128T. Bei pH_e 7,5/ -50 mV hatte das Intervall zum transienten Strom, nach Beginn einer anhaltenden Belichtung, eine Länge von 1,7 s und die Inaktivierung einen τ -Wert von 18 s (Abb. 3.7.12-C). Die *off*-Kinetik lag in der Größenordnung von C128T ($\tau_{\text{off}} = 2,83$ s), was auch die gleiche Lichtsensitivität von D156N erklärt. Nach Laserblitzaktivierung wurde für die Öffnung und das Schließen des Kanals ein τ -Wert von jeweils 3,7 ms und 1,8 s gemessen.

Nach dem Ende der Lichtapplikation (450 nm) konnte sowohl mit blau- als auch mit rotverschobenen Licht eine signifikante Beschleunigung der *off*-Kinetik ausgelöst werden (Abb. 3.7.12-D).

3.7.5 D156A und C128S/D156A

Es war relativ schwierig die Eigenschaften von D156A zu bestimmen, da zum einen die Photoströme sehr klein waren und zum anderen nur wenige stabile Messungen möglich waren. Zellen die D156A exprimierten, zeichneten sich durch einen geringen Membranwiderstand und hohe passive Ströme aus, die den Photostrom oft überlagerten und verschoben. Das bereitete insofern Probleme, da D156A offensichtlich eine extrem langsame *off*-Kinetik besitzt. In den wenigen stabilen Messungen konnte ich nach einer Anregung keine Abnahme der Kanalaktivität im Dunkeln beobachten (Abb. 3.7.13-A). Offensichtlich blieb der

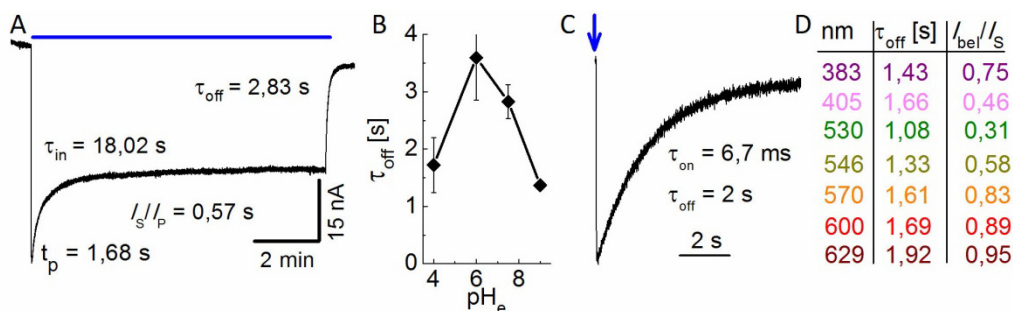


Abb. 3.7.12 Photoströme und Kinetiken von D156N. **A** Photostrom bei Anregung mit einem Lichtpuls (450 nm, blauer Balken) bei pH_e 7,5/ -50 mV sowie Durchschnittswerte der Kanalkinetiken (vgl. Abb. 3.7.2). **B** pH_e -Abhängigkeit der off-Kinetik bei -50 mV nach Anregung mit Lichtpulsen. **C** Photostrom nach Anregung mit Laserblitzen (470 nm, 10 ns, Pfeil) und durchschnittliche Werte für die τ -Werte der on- und off-Kinetik. **D** τ -Werte der beschleunigten off-Kinetik nach Applikation von Licht unterschiedlicher Wellenlänge während der off-Phase. I_{bel}/I_S : Effizienz der Deaktivierung, wird durch das Verhältnis der Stromamplitude während der Deaktivierungsphase (I_{bel}) zu I_S angegeben (vgl. Abb. 3.7.4).

Kanal nach der Aktivierung geöffnet. Erst durch eine minutenlange Anregung mit 629 nm wurde ein sehr langsamer Schließvorgang eingeleitet. Diese Mutation wurde auch von Baman et al. elektrophysiologisch charakterisiert [58]. Dort waren die Photoströme wesentlich stabiler. Die Messungen ergaben eine langsame aber stetige off-Kinetik mit einem τ -Wert von >150 s, womit sie immer noch langsamer wäre als die von C128S. Durch die Applizierung von 593 nm konnte der Kanal mit einem τ -Wert von ca. 0,5 s geschlossen werden.

Deutlich besser verliefen hingegen meine Messungen mit der Doppelmutante C128S/D156A (Abb. 3.7.13-B). Diese Variante wurde ursprünglich von Ofer Yizhar entwickelt, um eine langanhaltende Öffnung zu gewährleisten. Auch bei C128S/D156A genügte eine kurze Anregung mit blauem Licht, um den Kanal dauerhaft zu aktivieren. Auch nach 20 min konnte keine signifikante Abnahme der Stromamplituden festgestellt werden. Allerdings bewirkte die Applikation von rotem Licht (≥ 570 nm) das Schließen des Kanals. Dadurch war es möglich, den Kanal mit blauen und roten Licht abwechselnd zu öffnen und zu schließen. Eine effiziente Deaktivierung war aber erst ab einer Wellenlänge von 600 nm möglich. Nach Applikation von 570 nm zeigte der Kanal noch eine Aktivität von ca. 50%, wohingegen bei den C128 Mutanten durch 570 nm bereits eine Deaktivierung zwischen 88% und 96% erreicht werden konnte.

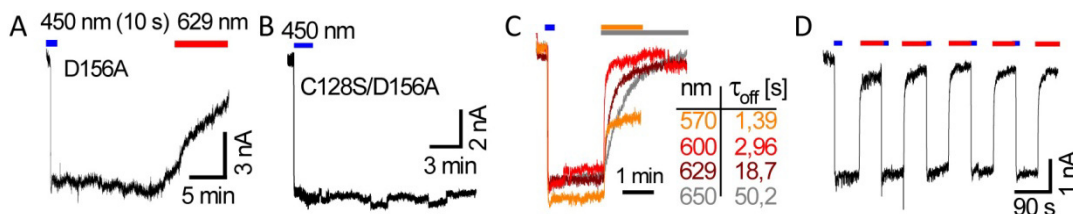


Abb. 3.7.13 Photoströme von D156A und C128S/D156A. (Na_e/pH_e 7,5/ -50 mV) **A** D156A Aktivierung mit 450 nm (10s, blauer Balken) führte zur dauerhaften Öffnung. Deaktivierung mit 629 nm (6 min, roter Balken) war hier langsam. **B** C128S/D156A Anregung (450 nm, 90 s) führte zur dauerhaften Öffnung **C** Lichtgesteuerte Kanalschließung von C128S/D156A nach Aktivierung mit 450 nm (3 s, blauer Balken) durch Applikation verschiedener Wellenlängen für 75 s (570 nm, oranger Balken) oder 180 s (600-650 nm, grauer Balken) **D** Alternierende Öffnung und Schließung von C128S/D156A durch Applikation von 450 nm (2s) und 600 nm (60 s).

3.8 Tabellarische Zusammenfassung und Statistik

3.8.1 Strom/Spannungskurven

Tab. 3.8.1 Stationäre Ströme unter Referenzbedingungen. Die Durchschnittswerte von I_s bei -100 mV mit 100 mM NaCl im Außenmedium, bei pH_e 7,5 wurden von allen verfügbaren Messungen gebildet (n: Mindestanzahl der Messungen, S.E.M: Standardfehler des Mittelwertes). *Bei E90L, E123L und D253E lagen die Stromamplituden meist unterhalb messbarer Werte.

Konstrukt (n)	I_s [nA] (\pm S.E.M)	Konstrukt (n)	I_s [nA] (\pm S.E.M)
ChR2-WT (43)	-19,7 \pm 2,0	H134S (8)	-3,8 \pm 0,4
E90Q (30)	-21,3 \pm 2,9	H134F (3)	-24,3 \pm 20,7
E90D (21)	-14,2 \pm 3,4	E123Q (8)	-7,4 \pm 1,8
E90H (23)	-7,4 \pm 1,1	E123D (8)	-3,2 \pm 1,2
E90K (7)	-3,2 \pm 0,8	E123T (9)	-21,5 \pm 6,2
E90A (5)	-18,7 \pm 3,0	E123A (5)	-18,2 \pm 7,1
E90L (> 6)*	(< 0,8)	E123L (> 6)*	(< 0,8)
K93Q (5)	-6,4 \pm 1,9	D253N (7)	-1,6 \pm 0,3
H134R (16)	-26,8 \pm 4,3	D253E (> 6)*	(< 0,8)
H134N (6)	-42,9 \pm 6,2	E235Q (3)	-3,6 \pm 1,0
H134D (3)	-8,0 \pm 2,8		

Tab. 3.8.2 Stationäre Ströme der SFO Varianten bei -50 mV. Die Durchschnittswerte von I_s mit 100 mM NaCl im Außenmedium, bei pH_e 7,5 wurden von allen verfügbaren Messungen gebildet (n: Mindestanzahl der Messungen, S.E.M: Standardfehler des Mittelwertes).

Konstrukt (n)	I_s [nA] (\pm S.E.M)	Konstrukt (n)	I_s [nA] (\pm S.E.M)
ChR2-WT (29)	-4,0 \pm 0,4	C128S (12)	-23,3 \pm 3,2
C128T (10)	-5,8 \pm 1,1	D156A (8)	-5,7 \pm 0,5
C128A (10)	-18,8 \pm 5,1	D156N (10)	-33,9 \pm 3,3

Tab. 3.8.3 Direkter Vergleich der Stromamplituden von ChR2-WT, H134R, T159C und T159C Derivaten unter Referenzbedingungen. Die I_s Amplituden bei -100 mV, pH_e 7,5, 100 mM NaCl im Außenmedium wurden immer im Vergleich zum Wildtyp gemessen (I_{WT}) und auf diesen Wert normiert. Expressionsbedingte Unterschiede an verschiedenen Messtagen wurden dadurch minimiert (n: Mindestanzahl der Messungen, S.E.M: Standardfehler des Mittelwertes).

Konstrukt (n)	I_s/I_{WT} (\pm S.E.M)	Konstrukt (n)	I_s/I_{WT} (\pm S.E.M)
ChR2-WT (15)	1	E123T/T159C (13)	2,5 \pm 0,2
H134R (9)	3,3 \pm 0,8	E123A/T159C (9)	1,6 \pm 0,3
T159C (9)	10,5 \pm 2,1	H134R/T159C (8)	3,5 \pm 0,5

Tab. 3.8.4 pH_e-abhängige Entwicklung des Einstroms in der Anfangsphase, in 100 mM NaCl. Die I_0 Amplituden bei -100 mV wurden jeweils auf den I_0 Wert bei pH_e 7,5 normiert (I_{ref}). (*nur stationäre Ströme berücksichtigt, †Einzelmessung, n: Mindestanzahl der Messungen, S.E.M: Standardfehler des Mittelwertes, n.g.: nicht gemessen)

100 mM Na _e / -100 mV:	pH _e 9	pH _e 7,5	pH _e 6	pH _e 4
Konstrukt (n)	I_0/I_{ref} (S.E.M)	I_0/I_{ref} (S.E.M)	I_0/I_{ref} (S.E.M)	I_0/I_{ref} (S.E.M)
ChR2-WT (15)	0,75 ± 0,21	1,00 ± 0,15	0,90 ± 0,22	1,54 ± 0,19
E90Q (10)	1,38 ± 0,07	1,00 ± 0,05	0,62 ± 0,06	1,27 ± 0,25
E90D (9)	0,54 ± 0,24	1,00 ± 0,84	1,24 ± 0,33	1,21 ± 0,33
E90H (6)	0,23 ± 0,09	1,00 ± 0,04	3,13 ± 0,71	7,35 ± 2,94
E90K (5)*	0,88 [†]	1,00 ± 0,01	3,69 ± 1,45	35,55 ± 7,00
E90A (3)	0,91 ± 0,04	1,00 ± 0,11	0,52 ± 0,28	0,49 ± 0,28
E90L (1)	n.g.	1,00 [†]	n.g.	8,71 [†]
K93Q (2)	0,56 ± 0,05	1,00 ± 0,21	1,44 ± 0,69	3,99 ± 1,1
H134R (5)	1,10 ± 0,43	1,00 ± 0,06	0,84 ± 0,22	1,54 ± 0,26
H134N (5)	1,15 ± 0,22	1,00 ± 0,17	0,56 ± 0,09	0,70 ± 0,25
H134D (3)	1,31 ± 0,31	1,00 ± 0,17	0,68 ± 0,07	0,51 ± 0,05
H134S (8)	1,46 ± 0,21	1,00 ± 0,11	0,56 ± 0,11	0,96 ± 0,21
H134F (2)	0,99 ± 0,13	1,00 ± 0,01	0,44 ± 0,14	1,56 ± 0,64
E123Q (8)	0,98 ± 0,16	1,00 ± 0,11	1,45 ± 0,41	2,09 ± 0,63
E123D (3)	0,83 ± 0,18	1,00 ± 0,28	0,88 ± 0,34	2,60 ± 1,47
E123T (8)	0,59 ± 0,15	1,00 ± 0,07	1,58 ± 0,27	3,12 ± 0,72
E123A (5)	0,44 ± 0,08	1,00 ± 0,89	2,63 ± 0,23	8,04 ± 1,64
E123L (1)	n.g.	1,00 [†]	1,73 [†]	2,88 [†]
D253N (4)	0,59 ± 0,65	1,00 ± 0,12	2,44 ± 0,74	13,94 ± 3,04
D253E (1)	n.g.	1,00 [†]	n.g.	2,19 [†]
E235Q (2)	0,56 ± 0,06	1,00 ± 0,22	1,44 ± 0,70	3,97 ± 1,10
T159C (3)	0,72 ± 0,26	1,00 ± 0,17	0,79 ± 0,03	1,38 ± 0,16
E123T/T159C (3)	0,70 ± 0,02	1,00 ± 0,22	1,70 ± 0,12	2,80 ± 0,10
C128T (3)	1,34 ± 0,21	1,00 ± 0,06	0,77 ± 0,12	1,85 [†]

Tab. 3.8.5 pH_e-abhängige Entwicklung des Einstroms in der Anfangsphase, in NMG-CI. Die I_0 Amplituden bei -100 mV wurden jeweils auf den I_0 Wert bei pH_e 7,5 normiert (I_{ref}). (*nur stationäre Ströme berücksichtigt, †Einzelmessung, n: Mindestanzahl der Messungen, S.E.M: Standardfehler des Mittelwertes)

0 mM Na _e / -100 mV:	pH _e 9	pH _e 7,5	pH _e 6	pH _e 4
Konstrukt (n)	I_0/I_{ref} (S.E.M)	I_0/I_{ref} (S.E.M)	I_0/I_{ref} (S.E.M)	I_0/I_{ref} (S.E.M)
ChR2-WT (7)	0,30 ± 0,1	1,00 ± 0,06	4,51 ± 0,29	11,90 ± 0,44
E90Q (9)	-0,03 ± 0,03	1,00 ± 0,11	4,49 ± 0,16	9,78 ± 0,58
E90D (9)	0,65 ± 0,10	1,00 ± 0,09	9,09 ± 0,57	21,91 ± 1,81
E90H (5)	-0,27 ± 0,05	1,00 ± 0,06	4,08 ± 0,49	10,84 ± 1,93
E90K (3)*	0,34 [†]	1,00 ± 0,03	4,37 ± 0,72	57,36 ± 9,59
H134R (4)	0,18 ± 0,08	1,00 ± 0,15	3,49 ± 0,27	10,15 ± 0,77
H134N (3)	-0,56 ± 0,33	1,00 ± 0,25	4,00 ± 0,75	9,99 ± 1,81
H134S (6)	0,30 ± 0,05	1,00 ± 0,11	2,06 ± 0,17	4,67 ± 0,45
E123Q (6)	-0,07 ± 0,14	1,00 ± 0,10	7,39 ± 0,70	15,12 ± 1,39
E123D (1)	0,45 [†]	1,00 [†]	5,97 [†]	14,90 [†]
E123T (6)	-0,07 ± 0,03	1,00 ± 0,19	5,88 ± 0,40	15,59 ± 1,36
E123A (5)	-0,08 ± 0,02	1,00 ± 0,05	8,63 ± 0,49	30,71 ± 2,80
T159C (3)	0,31 ± 0,08	1,00 ± 0,09	4,07 ± 0,76	13,14 ± 0,76

Tab. 3.8.6 Vergleich des Einstroms in An- und Abwesenheit von Na⁺. Angegeben ist jeweils das Verhältnis von I_s in 100 mM NMG-Cl zu I_s in 100 mM Na-Cl im Außenmedium bei -100 mV. (*nur stationäre Ströme berücksichtigt, †Einzelmessung, n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen)

-100 mV: Konstrukt (n)	pH _e 9 $I_s(\text{NMG})/I_s(\text{Na})$	pH _e 7,5 $I_s(\text{NMG})/I_s(\text{Na})$	pH _e 6 $I_s(\text{NMG})/I_s(\text{Na})$	pH _e 4 $I_s(\text{NMG})/I_s(\text{Na})$
ChR2-WT (7)	0,05	0,13	0,65	1,03
E90Q (9)	0	0,13	0,93	0,96
E90D (9)	0,13	0,1	0,4	0,97
E90H (5)	-0,78	0,68	0,93	1,01
E90K (3)*	0,21 [†]	0,54	0,64	0,88
E90A (3)	0,1 [†]	0,1	0,39 [†]	n.g.
K93Q (1)	n.g.	0,09 [†]	n.g.	n.g.
H134R (4)	0,04	0,2	0,62	1,04
H134N (3)	-0,01	0,09	0,5	1,03
H134D (2)	0,02	0,12	0,66	1,01
H134S (6)	0,04	0,18	0,75	0,98
H134F (1)	n.g.	0,28 [†]	n.g.	n.g.
E123Q (6)	0,02	0,14	0,71	1,04
E123D (1)	0,12 [†]	0,14 [†]	0,82 [†]	1,02 [†]
E123T (6)	-0,01	0,26	0,75	0,98
E123A (5)	-0,03	0,31	0,86	1,04
E235Q (1)	n.g.	0,09 [†]	n.g.	n.g.
T159C (3)	0,06	0,11	0,54	1,03
E123T/T159C (4)	n.g.	0,22	n.g.	n.g.
C128T (1)	n.g.	0,18 [†]	n.g.	n.g.

Tab. 3.8.7 Umkehrpotentiale des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na⁺. *Mit kleinen Spannungssprüngen nahe dem Umkehrpotentials gemessen (†Einzelmessung, n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen).

$V_r(I_s)$ Konstrukt (n)	pH _e 9 [mV]		pH _e 7,5 [mV]		pH _e 6 [mV]		pH _e 4 [mV]	
	Na	NMG	Na	NMG	Na	NMG	Na	NMG
ChR2-WT* (6)	-31	-81	-7	-35	+52	+50	>+75	>+75
E90Q* (5)	-10	-98	-3	-48	+18	+18	+22	+28
E90D (9)	-8	-64	+1	-43	+35	+29	>+75	>+75
E90H* (3)	-83	-122	-28	-39	+23	+22	+47	+41
E90K (3)	-19	-54 [†]	-19	-40	-3	+4	+10	+11
E90A (3)	-5	-59 [†]	-1	-42	+11	+3 [†]	+12	n.g.
E90L (1)	n.g.	n.g.	-1 [†]	n.g.	n.g.	n.g.	+49	n.g.
K93Q (1)	-36 [†]	n.g.	-1	-40 [†]	+37 [†]	n.g.	>+75	>+75
H134R (4)	-21	-80	+1	-21	+49	+51	>+75	>+75
H134N (3)	-10	-105	±0	-53	+47	+15	>+75	>+75
H134D (2)	-11	-91	-1	-52	+39	+17	>+75	>+75
H134S* (3)	-13	-76	-4	-27	+47	+51	>+75	>+75
H134F (2)	-33	n.g.	-9	-35	+39	n.g.	>+75	>+75
E123Q* (3)	-33	-104	-8	-46	+41	+42	>+75	>+75
E123D (3)	-16	-67 [†]	-8	-61 [†]	+33	n.g.	>+75	>+75
E123T* (5)	-34	-99	-13	-30	+39	+42	>+75	>+75
E123A* (5)	-51	-103	-12	-34	+45	+44	>+75	>+75
D253N (4)	-36	n.g.	-17	-49 [†]	+44	n.g.	>+75	>+75
E235Q (2)	-36	n.g.	-1	-41 [†]	+37	n.g.	>+75	>+75
T159C (3)	-20	-71	-1	-32	+60	+52	>+75	>+75
E123T/T159C (3)	-24	n.g.	-6	-33	+51	n.g.	>+75	>+75
C128T (3)	-30	n.g.	-7	n.g.	+46	n.g.	>+75	>+75

Tab. 3.8.8 Differenz der Umkehrpotentiale von I_0 und I_S . Bei negativen Werten war $V_r(I_0)$ negativer als $V_r(I_S)$. *Mit kleinen Spannungssprüngen nahe dem Umkehrpotential gemessen, andernfalls wurden die Werte direkt aus den Strom/Spannungskurven ausgelesen (mit $\Delta E = 25$ mV). Beim Vergleich der Werte eines Konstrukts dessen Umkehrpotentiale mit kleinen Spannungssprüngen gemessen wurden, mit denen die direkt aus den Strom/Spannungskurven stammen ergab sich unter neutralen und basischen Bedingungen eine hohe Übereinstimmung. Daher kann bei den Konstrukten deren Werte aus den I/V Kurven stammen dort von einer hohen Signifikanz ausgegangen werden (s. ChR2-WT) (n: Mindestanzahl der Messungen, S.E.M. Standardfehler des Mittelwertes).

$V_r(I_0) - V_r(I_S)$ Konstrukt (n)	pH _e 9 [mV] (S.E.M)		pH _e 7,5 [mV] (S.E.M)		pH _e 6 [mV] (S.E.M)	
	Na	NMG	Na	NMG	Na	NMG
ChR2-WT* (6)	+12,3 ± 0,7	-0,1 ± 2,4	+3,2 ± 0,3	-1,2 ± 0,8	+1,2 ± 0,3	+1,6 ± 0,7
ChR2-WT (7)	+13,3	+0,3	+3,4	+1,4	+7,4	+5,8
E90Q* (5)	+3,5 ± 0,4	-3,7 ± 1,4	+1,9 ± 0,4	+0,7 ± 0,6	+3,0 ± 0,7	+2,7 ± 0,4
E90D (9)	+8	-8	4	-3	0	-1
H134R (4)	+2	-1	+3	±0	+2	+3
H134N (3)	+2	-2	+2	-4	+3	+4
H134S (6)	+4,8	+6	+4	+6	+7	+6
E123Q* (3)	+3,7 ± 1,5	-6,9 ± 0,7	-2,6 ± 0,6	-1,8 ± 1,1	+1,5 ± 0,6	+2,6 ± 0,3
E123D (3)	+3,8	n.g.	+11,4	n.g.	+9	n.g.
E123T* (4)	+6,7 ± 2	-7 ± 1,9	-0,3 ± 0,6	-13,3 ± 2,2	-1,9 ± 1,3	-2,8 ± 0,6
E123A* (4)	+4,3 ± 1,6	-1,9 ± 1,4	+2,1 ± 0,6	-4,5 ± 2,4	+2,6 ± 2,7	+1,7 ± 1,3
T159C (3)	+4	-3	+1	-1	-2	+2

3.8.2 Kinetiken der Stromspuren während und nach Anregung mit Lichtpulsen

Werden statt monoexponentieller nur biexponentielle Parameter angegeben, war der Korrelationskoeffizient des monoexponentiellen Fits unter 0,95 und wurde als nicht mehr akzeptabel betrachtet. Bei alleiniger Angabe von monoexponentiellen Parametern erreichten bi- und monoexponentielle Fits etwa die gleiche Korrelation. Bei Angabe von mono- und biexponentiellen Parameter waren monoexponentielle Fits akzeptabel, ließen sich aber durch biexponentielle Funktionen leicht verbessern.

Tab. 3.8.9 Intervall zum transienten Strom bei Anregung mit Lichtpulsen. Vor der Lichtapplikation blieben die Proben so lange im Dunkeln, bis der transiente Strom vollständig wiederhergestellt war. Dauer bis zum Erreichen des transienten Stroms (t_P) nach Beginn der Anregung bei -100 mV. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen)

100 mM Na _e / -100 mV: Konstrukt (n)	pH _e 9 t_P [ms]	pH _e 7,5 t_P [ms]	pH _e 6 t_P [ms]	pH _e 4 t_P [ms]
ChR2-WT (9)	10,3 ± 0,4	12,1 ± 0,5	13,8 ± 0,9	11,4 ± 0,7
E90Q (8)	11,6 ± 0,3	12,4 ± 0,6	12,1 ± 0,4	10,6 ± 0,3
E90D (9)	12,0 ± 0,5	13,4 ± 0,4	14,8 ± 0,2	18,9 ± 1,3
E90H (6)	n.g.	17,0 ± 3,4	15,5 ± 2,3	10,0 ± 0,9
H134R (5)	11,6 ± 0,3	14,3 ± 0,9	13,6 ± 0,3	14,4 ± 0,4
H134N (5)	15,2 ± 0,3	14,8 ± 0,4	14,3 ± 0,2	13,1 ± 0,2
H134D (3)	10,3 ± 0,2	11,1 ± 0,4	11,3 ± 0,2	13,0 ± 0,7
H134S (5)	15,8 ± 0,7	17,5 ± 0,8	15,4 ± 0,19	9,9 ± 0,48
H134F (3)	n.g.	11,0 ± 0,5	n.g.	n.g.
E123Q (7)	10,6 ± 0,5	9,7 ± 0,4	8,2 ± 0,6	7,2 ± 0,5
E123D (3)	11,1 ± 0,4	11,1 ± 0,1	11,8 ± 0,3	10,6 ± 1,6
E123T (7)	8,5 ± 0,8	7,8 ± 0,4	8,2 ± 0,5	7,0 ± 0,4
E123A (4)	7,8 ± 0,5	7,1 ± 0,1	7,8 ± 0,4	7,0 ± 0,3
D253N (3)	n.g.	10,4 ± 0,2	10,3 ± 0,7	10,9 ± 0,2
E235Q (2)	n.g.	10,6 ± 0,3	10,9 ± 0,2	11,0 ± 0,2
T159C (3)	11,5 ± 0,4	16,4 ± 0,7	14,8 ± 0,8	13,6 ± 0,1
E123T/T159C (3)	8,1 ± 0,3	8,5 ± 0,3	8,5 ± 0,2	7,4 ± 0,2
E123A/T159C (9)	n.g.	9,8 ± 0,4	n.g.	n.g.
H134R/T159C (8)	n.g.	15,6 ± 0,7	n.g.	n.g.

Tab. 3.8.10 τ -Werte der Inaktivierung bei Anregung mit Lichtpulsen. Vor der Lichtapplikation blieben die Proben so lange im Dunkeln, bis der transiente Strom vollständig wiederhergestellt war. Der Übergang von I_P nach I_S bei -100 mV wurde mit monoexponentiellen Funktionen gefittet. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen, biexp.: akzeptable Korrelation nur bei Verwendung von biexponentiellen Funktionen)

100 mM Na _e / -100 mV:	pH _e 9	pH _e 7,5	pH _e 6	pH _e 4
Konstrukt (n)	τ_{in} [ms]	τ_{in} [ms]	τ_{in} [ms]	τ_{in} [ms]
ChR2-WT (9)	30,7 ± 2,4	48,1 ± 3,2	75,6 ± 4,1	40,8 ± 1,6
E90Q (8)	31,9 ± 1,4	35,9 ± 1,8	38,4 ± 2,5	25,7 ± 1,3
E90D (9)	32,1 ± 2,2	37,0 ± 1,4	39,6 ± 2,9	46,0 ± 5,6
E90H (6)	n.g.	30,2 ± 8,3	28,5 ± 4,5	23,4 ± 5,2
H134R (5)	23,3 ± 2,3	26,0 ± 2,0	31,4 ± 2,7	28,1 ± 2,3
H134N (5)	62,0 ± 3,5	45,1 ± 2,0	40,4 ± 2,6	46,7 ± 3,3
H134D (3)	16,8 ± 1,2	24,7 ± 1,7	24,1 ± 2,2	30,2 ± 1,9
H134S (5)	19,4 ± 4,7	32,8 ± 3,0	33,5 ± 3,4	23,6 ± 3,7
H134F (3)	n.g.	27,1 ± 2,0	n.g.	n.g.
E123Q (7)	31,0 ± 1,3	30,8 ± 2,2	23,3 ± 3,0	11,8 ± 1,2
E123D (3)	32,4 ± 3,1	53,5 ± 4,1	82,8 ± 6,0	46,9 ± 8,8
E123T (7)	19,4 ± 1,7	17,3 ± 1,8	14,3 ± 1,3	9,9 ± 0,8
E123A (4)	22,6 ± 2,7	15,0 ± 2,0	11,6 ± 1,6	10,4 ± 0,8
D253N (3)	n.g.	23,8 ± 2,4	25,5 ± 2,5	36,6 ± 3,5
E235Q (2)	n.g.	27,6 ± 1,6	33,4 ± 2,1	33,6 ± 1,4
T159C (3)	40 ± 0,6	52,2 ± 2,3	106,6 ± 5,9	50,1 ± 4,2
E123T/T159C (3)	28,1 ± 1,0	27,3 ± 1,9	38,8 ± 2,7	biexp.
E123A/T159C (9)	n.g.	34,6 ± 0,9	n.g.	n.g.
H134R/T159C (8)	n.g.	31,1 ± 7,0	n.g.	n.g.

Tab. 3.8.11 τ -Werte der off-Kinetik nach Lichtpulsen. Der Abfall von I_S bei -100 mV wurde mit monoexponentiellen Funktionen gefittet. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen, biexp.: akzeptable Korrelation nur bei Verwendung von biexponentiellen Funktionen)

100 mM Na _e / -100 mV:	pH _e 9	pH _e 7,5	pH _e 6	pH _e 4
Konstrukt (n)	τ_{off} [ms]	τ_{off} [ms]	τ_{off} [ms]	τ_{off} [ms]
ChR2-WT (9)	17,5 ± 1,6	9,6 ± 0,5	9,3 ± 0,7	10,2 ± 0,44
E90Q (8)	9,1 ± 0,4	8,0 ± 0,7	9,5 ± 0,5	10,8 ± 0,7
E90D (9)	12,3 ± 0,7	12,5 ± 0,6	14,6 ± 1,2	20,8 ± 1,8
E90H (6)	n.g.	17,5 ± 1,3	12,3 ± 0,8	8,4 ± 0,3
H134R (5)	12,7 ± 0,7	14,4 ± 0,9	12,0 ± 0,5	16,5 ± 0,4
H134N (5)	biexp.	28,6 ± 2,0	18,2 ± 0,8	17,7 ± 1,2
H134D (3)	biexp.	biexp.	biexp.	biexp.
H134S (5)	biexp.	16,5 ± 1,1	11,8 ± 1,4	12,9 ± 1,5
H134F (3)	n.g.	11,6 ± 0,1	n.g.	n.g.
E123Q (7)	biexp.	7,0 ± 0,4	6,7 ± 0,4	6,4 ± 0,4
E123D (3)	biexp.	15,5 ± 1,5	14,8 ± 0,8	11,5 ± 2,2
E123T (7)	biexp.	7,3 ± 0,7	6,0 ± 0,4	5,3 ± 0,5
E123A (4)	biexp.	7,3 ± 0,5	5,1 ± 0,2	5,3 ± 0,3
D253N (3)	n.g.	n.g.	11,1 ± 1,6	9,2 ± 0,9
E235Q (2)	n.g.	8,7 ± 0,4	11,1 ± 1,9	12,3 ± 1,6
T159C (3)	13,2 ± 1,8	18,8 ± 0,7	13,5 ± 0,7	26,0 ± 1,1
E123T/T159C (3)	biexp.	11,0 ± 0,8	10,0 ± 0,2	9,0 ± 0,4
E123A/T159C (9)	n.g.	13,6 ± 1,0	n.g.	n.g.
H134R/T159C (8)	n.g.	41,6 ± 0,3	n.g.	n.g.

Tab. 3.8.12 τ -Werte der Inaktivierung bei Verwendung biexponentieller Fitfunktionen. Die Stromspuren bei -100 mV wurden jeweils mit biexponentiellen Funktionen angepasst. A_2/A_1 bezeichnet das Verhältnis der Amplituden von langsamer zur schnellen Komponente. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen, mono.: keine signifikant verbesserte Korrelation bei Verwendung von biexponentiellen Funktionen)

100 mM Na _e / -100 mV:	pH _e 9			pH _e 7,5			pH _e 6			pH _e 4		
Konstrukt (n)	τ_{in1} [ms]	τ_{in2} [ms]	A_2/A_1	τ_{in1} [ms]	τ_{in2} [ms]	A_2/A_1	τ_{in1} [ms]	τ_{in2} [ms]	A_2/A_1	τ_{in1} [ms]	τ_{in2} [ms]	A_2/A_1
ChR2-WT (9)	24,9 ± 1,6	106 ± 10	0,13 ± 0,02	31,0 ± 1,9	101 ± 8	0,36 ± 0,04	37,0 ± 2,9	121 ± 9	1,21 ± 0,11	18,4 ± 2,5	64,6 ± 4,1	0,85 ± 0,21
H134R (5)	mono			mono			mono			mono		
H134N (5)	27,3 ± 1,0	152 ± 5	0,34 ± 0,05	27,2 ± 0,3	150 ± 9	0,32 ± 0,06	25,3 ± 2,7	69 ± 12	0,69 ± 0,23	mono		
H134D (3)	mono			mono			Mono			mono		
H134S (5)	mono			mono			mono			mono		
H134F (3)	n.g.			22,0 ± 2,2	119 ± 59	0,16 ± 0,07	n.g.			n.g.		
E123Q (7)	mono			13,0 ± 1,6	49,0 ± 3,4	1,1 ± 0,1	12,2 ± 1,8	56,1 ± 8,7	0,42 ± 0,05	8,3 ± 0,4	61,5 ± 16,9	0,09 ± 0,03
E123D (3)	23,1 ± 0,5	141 ± 29	0,17 ± 0,05	28,8 ± 1,4	104 ± 10	0,57 ± 0,13	36,8 ± 1,7	141 ± 3	1,0 ± 0,13	18,3 ± 5,2	93 ± 18	0,70 ± 0,06
E123T (7)	12,2 ± 1,9	49,0 ± 10,7	0,27 ± 0,05	8,5 ± 0,8	41,5 ± 4,5	0,51 ± 0,08	7,6 ± 0,2	39,9 ± 2,1	0,32 ± 0,11	6,7 ± 0,4	37,9 ± 5,6	0,22 ± 0,02
E123A (4)	15,0 ± 3,2	80 ± 20	0,49 ± 0,3	7,6 ± 0,9	44,6 ± 3,0	0,31 ± 0,03	6,8 ± 0,4	49 ± 4	0,20 ± 0,03	7,8 ± 0,5	43,7 ± 5,3	0,08 ± 0,02
D253N (3)	n.g.			mono			mono			14,6 ± 1,9	78 ± 13	0,60 ± 0,08
E235Q (2)	n.g.			mono			mono			Mono		
T159C (3)	26,5 ± 0,6	107 ± 6	0,22 ± 0,02	37,2 ± 2,1	151 ± 13	0,39 ± 0,02	33,7 ± 2,3	158 ± 11	1,2 ± 0,2	18,2 ± 1,2	93 ± 7	0,71 ± 0,03
E123T/T159C (3)	15,7 ± 0,1	73,4 ± 2,4	0,29 ± 0,03	13,4 ± 1,0	66,6 ± 3,2	0,44 ± 0,03	13,6 ± 0,6	100 ± 5	0,37 ± 0,03	7,6	53,4	0,3

Tab. 3.8.13 τ -Werte der off-Kinetik bei Verwendung biexponentieller Fitfunktionen. Die Stromspuren nach Ende der kontinuierlichen Anregung, bei -100 mV wurden jeweils mit biexponentiellen Funktionen angepasst. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen, mono.: keine signifikant verbesserte Korrelation bei Verwendung von biexponentiellen Funktionen)

100 mM Na _e / -100 mV:	pH _e 9			pH _e 7,5			pH _e 6			pH _e 4		
Konstrukt (n)	τ_{off1} [ms]	τ_{off2} [ms]	A_2/A_1	τ_{off1} [ms]	τ_{off2} [ms]	A_2/A_1	τ_{off1} [ms]	τ_{off2} [ms]	A_2/A_1	τ_{off1} [ms]	τ_{off2} [ms]	A_2/A_1
ChR2-WT (9)	9,1 ± 1,0	86,4 ± 8,3	0,29 ± 0,05	7,7 ± 0,6	77,3 ± 11,9	0,04 ± 0,05	8,7 ± 0,6	91,2 ± 16,0	0,05 ± 0,02	8,3 ± 0,4	36,7 ± 2,8	0,14 ± 0,02
H134R (5)	10,3 ± 0,4	41,1 ± 4,4	0,18 ± 0,03	11,3 ± 0,6	38,6 ± 3,1	0,09 ± 0,02	10,5 ± 0,2	47,5 ± 4,5	0,13 ± 0,02	12,9 ± 0,4	48,8 ± 8,3	0,22 ± 0,05
H134N (5)	18,2 ± 1,0	150 ± 17	0,29 ± 0,01	18,5 ± 1,6	119 ± 18	0,21 ± 0,02	14,8 ± 1,8	108 ± 10	0,1 ± 0,02	12,9 ± 1,6	70,8 ± 8,0	0,2 ± 0,04
H134D (3)	51 ± 21	420 ± 40	1,9 ± 0,2	23,1 ± 1,4	383 ± 19	1,1 ± 0,1	31,6 ± 0,8	304 ± 33	1,1 ± 0,2	23,3 ± 4,1	357 ± 39	1,1 ± 0,1
H134S (5)	16,3 ± 1,3	191 ± 20	0,76 ± 0,08	14,4 ± 1,9	237 ± 44	0,29 ± 0,11	mono			mono		
H134F (3)	n.g.			7,2 ± 0,8	54,3 ± 8,8	0,11 ± 0,06	n.g.			n.g.		
E123Q (7)	7,2 ± 1,5	160 ± 24	0,25 ± 0,11	5,9 ± 0,1	46,8 ± 5,6	0,08 ± 0,01	mono			mono		
E123D (3)	28,8 ± 7,2	156 ± 14	0,58 ± 0,02	11,5 ± 0,6	191 ± 10	0,13 ± 0,01	mono			mono		
E123T (7)	9,0 ± 1,9	84 ± 13	0,56 ± 0,11	4,7 ± 0,6	44,0 ± 4,2	0,20 ± 0,03	4,7 ± 0,3	31 ± 11	0,20 ± 0,06	mono		
E123A (4)	10,6 ± 2,5	90 ± 26	0,18 ± 0,03	4,3 ± 0,2	29,8 ± 2,6	0,12 ± 0,01	mono			mono		
D253N (3)	n.g.			n.g.			7,0 ± 0,6	45 ± 7	0,41 ± 0,07	7,9 ± 1,0	32,5 ± 3,5	0,13 ± 0,01
E235Q (2)	n.g.			6,5 ± 0,33	70 ± 16	0,07 ± 0,03	7,1 ± 0,3	61 ± 7	0,09 ± 0,03	9,6 ± 0,3	66 ± 8	0,08 ± 0,04
T159C (3)	9,1 ± 0,7	110 ± 23	0,13 ± 0,01	12,2 ± 0,7	76,1 ± 3,8	0,08 ± 0,02	11,2 ± 0,4	43,4 ± 3,6	0,12 ± 0,03	16,3 ± 1,3	46,5 ± 3,4	0,59 ± 0,03
E123T/T159C (3)	11,6 ± 1,5	76 ± 10	0,41 ± 0,05	7,6 ± 0,2	77 ± 7	0,16 ± 0,02	7,8 ± 0,3	59 ± 8	0,08 ± 0,02	mono		

Tab. 3.8.14 Verhältnis von I_0 zu I_s bei Lichtpulsen bei -100 mV. Angabe erfolgt zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwerts. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen)

100 mM Na _e / -100 mV: Konstrukt (n)	pH _e 9 I_s/I_0	pH _e 7,5 I_s/I_0	pH _e 6 I_s/I_0	pH _e 4 I_s/I_0
ChR2-WT (9)	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,65 ± 0,05
E90Q (8)	0,21 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,63 ± 0,02
E90D (9)	0,44 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,59 ± 0,02	0,89 ± 0,02
E90H (6)	0,68 ± 0,02	0,80 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,80 ± 0,04
H134R (5)	0,34 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,56 ± 0,17	0,73 ± 0,03
H134N (5)	0,43 ± 0,06	0,43 ± 0,04	0,56 ± 0,03	0,72 ± 0,04
H134D (3)	0,45 ± 0,04	0,41 ± 0,04	0,38 ± 0,02	0,67 ± 0,07
H134S (5)	0,95 ± 0,12	0,59 ± 0,03	0,63 ± 0,04	0,78 ± 0,02
H134F (3)	n.g.	0,41 ± 0,01	n.g.	n.g.
E123Q (7)	0,30 ± 0,05	0,46 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,02
E123D (3)	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,30 ± 0,03	0,43 ± 0,03
E123T (7)	0,31 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,38 ± 0,01
E123A (4)	0,39 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,47 ± 0,03
D253N (3)	n.g.	0,55 ± 0,05	0,53 ± 0,05	0,54 ± 0,03
E235Q (2)	n.g.	0,24 ± 0,04	0,47 ± 0,06	0,68 ± 0,01
T159C (3)	0,17 ± 0,01	0,27 ± 0,03	0,46 ± 0,01	0,61 ± 0,01
E123T/T159C (3)	0,26 ± 0,01	0,31 ± 0,05	0,42 ± 0,01	0,41 ± 0,02
E123A/T159C (9)	n.g.	0,50 ± 0,01	n.g.	n.g.
H134R/T159C (8)	n.g.	0,63 ± 0,07	n.g.	n.g.

Tab. 3.8.15 τ -Wert der Recoverykinetik bei -75 mV. Angabe erfolgt zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwerts. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen, †Einzelmessung)

100 mM Na _e / -75 mV: Konstrukt (n)	pH _e 9 τ_{in} [s]	pH _e 7,5 τ_{in} [s]	pH _e 6 τ_{in} [s]	pH _e 4 τ_{in} [s]
ChR2-WT (6)	27,3 ± 3,9	10,7 ± 0,5	4,3 ± 0,4	0,67 ± 0,07
E90Q (4)	18,0 ± 1,3	6,6 ± 0,3	1,5 ± 0,1	0,35 ± 0,05
E90D (4)	8,7 ± 0,7	14,0 ± 1,2	6,5 ± 0,3	n.g.
H134N (1)	n.g.	12,7 [†]	n.g.	n.g.
H134F (3)	n.g.	9,5 [†]	n.g.	n.g.
E123Q (4)	1,83 ± 0,24	0,32 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,01
E123D (3)	102 [†]	29,5 ± 2,3	7,1 ± 0,5	0,84 [†]
E123T (4)	5,78 ± 0,76	0,98 ± 0,13	0,48 ± 0,01	0,13 ± 0,03
E123A (4)	4,74 ± 0,78	0,78 ± 0,02	0,24 ± 0,05	0,16 ± 0,03
T159C (6)	n.g.	16,4 ± 0,9	n.g.	n.g.
E123T/T159C (6)	n.g.	2,6 ± 0,1	n.g.	n.g.
C128T (1)	n.g.	30,1 [†]	n.g.	n.g.

3.8.3 Kinetiken der Stromspuren nach Laserblitzanregung

Tab. 3.8.16 Intervall zum Maximalstrom nach Laserblitzaktivierung. Die Länge des Intervalls (t_p) vom Zeitpunkt der Anregung bis zum Erreichen des Maximalstroms (I_p) bei -100 mV wird zusammen mit dem Standardfehler angegeben. Bei schnellen *on*-Kinetiken überlagerte sich der Strom zu Beginn mit kapazitiven Strömen und der Maximalstrom (I_p) konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Daher konnte in diesen Fällen nur die *off*-Kinetik ausgelesen werden. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen, †Einzelmessung)

100 mM Na _e / -100 mV:	pH _e 9	pH _e 7,5	pH _e 6	pH _e 4
Konstrukt (n)	t_p [ms]	t_p [ms]	t_p [ms]	t_p [ms]
ChR2-WT (5)	1,79 ± 0,16	2,37 ± 0,11	2,22 ± 0,17	1,29 ± 0,15
E90Q (3)	n.g.	1,24 ± 0,18	n.g.	1,01 ± 0,42
H134R (9)	n.g.	3,23 ± 0,03	n.g.	n.g.
H134N (1)	n.g.	3,31 [†]	n.g.	n.g.
E123Q (4)	n.g.	0,64 ± 0,08	n.g.	n.g.
E123D (3)	2,11 ± 0,12	2,78 ± 0,06	2,32 ± 0,30	1,38 [†]
E123T (3)	0,98 ± 0,01	0,90 ± 0,08	1,05 [†]	1,20 ± 0,06
E123A (1)	0,83 [†]	0,73 [†]	0,99 [†]	0,92 [†]
T159C (3)	n.g.	5,37 ± 0,31	n.g.	n.g.
E123T/T159C (3)	n.g.	2,15 ± 0,12	n.g.	n.g.

Tab. 3.8.17 off-Kinetik nach Laserblitzanregung bei -100 mV. Der Abfall vom Maximalstrom (I_p) wurde mit monoexponentiellen Funktionen angepasst. Die Angabe des τ -Wertes erfolgt mit dem Standardfehler des Mittelwertes. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen, †Einzelmessung)

100 mM Na _e / -100 mV:	pH _e 9	pH _e 7,5	pH _e 6	pH _e 4
Konstrukt (n)	τ_{off} [ms]	τ_{off} [ms]	τ_{off} [ms]	τ_{off} [ms]
ChR2-WT (5)	9,18 ± 0,97	9,50 ± 0,67	9,93 ± 0,65	9,42 ± 0,75
E90Q (3)	n.g.	7,56 ± 0,41	n.g.	9,48 ± 0,57
H134R (9)	n.g.	17,56 ± 0,21	n.g.	n.g.
H134N (1)	n.g.	24,10 [†]	n.g.	n.g.
E123Q (4)	4,58 [†]	4,82 ± 0,24	4,41 ± 0,01	4,74 ± 0,11
E123D (3)	11,33 ± 1,91	11,38 ± 0,77	11,56 ± 0,32	7,62 ± 0,42
E123T (3)	3,71 ± 0,24	3,92 ± 0,20	5,00 ± 0,14	4,17 ± 0,19
E123A (3)	3,49 ± 0,11	4,01 ± 0,10	5,18 ± 0,20	5,05 ± 0,26
T159C (3)	n.g.	19,9 ± 0,2	n.g.	n.g.
E123T/T159C (3)	n.g.	7,93 ± 0,18	n.g.	n.g.

Tab. 3.8.18 off-Kinetik nach Laserblitzanregung bei +50 mV. Der Abfall vom Maximalstrom (I_p) wurde mit monoexponentiellen Funktionen angepasst. Die Angabe des τ -Wertes erfolgt mit dem Standardfehler des Mittelwertes. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen, †Einzelmessung)

100 mM Na _e / +50 mV:	pH _e 9	pH _e 7,5	pH _e 6	pH _e 4
Konstrukt (n)	τ_{off} [ms]	τ_{off} [ms]	τ_{off} [ms]	τ_{off} [ms]
ChR2-WT (5)	14,58 ± 2,23	22,71 ± 2,37	n.g.	14,48 ± 1,08
E90Q (3)	n.g.	13,31 ± 0,37	n.g.	15,25 ± 0,84
H134R (9)	n.g.	47,6 ± 1,1	n.g.	n.g.
E123Q (4)	4,51 [†]	4,58 ± 0,57	n.g.	5,82 ± 0,18
E123D (3)	n.g.	n.g.	n.g.	14,53 ± 0,62
E123T (3)	3,71 ± 0,24	4,51 ± 0,32	n.g.	4,02 ± 0,19
E123A (3)	4,91 ± 0,10	6,96 ± 0,60	n.g.	9,34 ± 0,11
T159C (3)	n.g.	70,6 ± 2,2	n.g.	n.g.
E123T/T159C (3)	n.g.	8,66 ± 0,32	n.g.	n.g.

3.8.4 Kinetiken der *step-function opsins*

Tab. 3.8.19 Intervall zum transienten Strom bei kontinuierlicher Anregung. Dauer bis zum Erreichen des transienten Stroms (I_P) nach Beginn der Anregung bei -50 mV. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen)

100 mM Na _e / -50 mV:	pH _e 7,5	Konstrukt (n)	pH _e 7,5
Konstrukt (n)	t_P [ms]		t_P [ms]
C128T (11)	392 ± 69	D156N (5)	1676 ± 367
C128A (13)	853 ± 124		

Tab. 3.8.20 τ -Werte der Inaktivierung bei kontinuierlicher Anregung. Der Übergang von I_P nach I_S bei -100 mV wurde mit monoexponentiellen Funktionen gefittet. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen, [†]Einzelmessung)

100 mM Na _e / -50 mV:	pH _e 7,5	Konstrukte (n)	pH _e 7,5
Konstrukt (n)	τ_{in} [s]		τ_{in} [ms]
C128T (11)	4,9 ± 0,8	D156N (5)	18 ± 4
C128A (1)	421 [†]		

Tab. 3.8.21 Verhältnis von I_0 zu I_S unter kontinuierlicher Anregung bei -100 mV. Die Angabe erfolgt zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwerts. (n: Mindestanzahl der Messungen)

100 mM Na _e / -50 mV:	pH _e 7,5	Konstrukte (n)	pH _e 7,5
Konstrukt (n)	I_S/I_0 (S.E.M)		I_S/I_0 (S.E.M)
C128T (11)	0,52 ± 0,01	D156N (5)	0,57 ± 0,4
C128A (1)	0,23 [†]		

Tab. 3.8.22 τ -Werte der off-Kinetik nach kontinuierlicher Anregung. Der Abfall von I_S bei -50 mV wurde mit monoexponentiellen Funktionen gefittet. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen)

100 mM Na _e / -50 mV:	pH _e 9	pH _e 7,5	pH _e 6	pH _e 4
Konstrukt (n)	τ_{off} [s]	τ_{off} [s]	τ_{off} [s]	τ_{off} [s]
C128T (4)	2,01 ± 0,75	2,08 ± 0,14	1,87 ± 0,21	0,84 ± 0,13
C128A (3)	n.g.	52,3 ± 0,8	32,2 ± 2,2	13,6 ± 1,6
C128S (3)	n.g.	105,3 ± 4,1	39,4 ± 2,7	26,7 ± 2,8
D156N (4)	1,37 ± 0,07	2,83 ± 0,29	3,59 ± 0,74	1,72 ± 0,47

Tab. 3.8.23 τ -Werte der off-Kinetik nach kontinuierlicher Anregung bei pH_e 7,5 bei Verwendung biexponentieller Fitfunktionen A_2/A_1 bezeichnet das Verhältnis der Amplituden von langsamer zur schnellen Komponente. (n: Mindestanzahl der Messungen)

100 mM Na _e / -50 mV:	pH _e 7,5		
Konstrukt (n)	τ_{off1} [s]	τ_{off2} [s]	A_2/A_1
C128T (9)	1,34 ± 0,05	6,80 ± 1,12	0,55 ± 0,04
C128A (4)	5,08 ± 1,05	55,9 ± 1,5	6,9 ± 0,7
C128S (4)	23,8 ± 5,2	117,8 ± 5,9	5,5 ± 0,9
D156N (11)	1,54 ± 0,18	4,37 ± 0,53	1,1 ± 0,2

Tab. 3.8.24 τ -Werte der *on*-Kinetik nach Laserblitzanregung bei -75 mV. Der Anstieg von I_P wurde mit monoexponentiellen Funktionen gefittet. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen)

100 mM Na _e / -75 mV: Konstrukt (n)	pH _e 7,5 τ_{on} [ms]	pH _e 4 τ_{on} [ms]
C128T (4)	5,39 ± 0,67	2,24 ± 0,27
C128A (4)	3,11 ± 0,28	0,96 ± 0,16
C128S (3)	25,7 ± 1,9	2,92 ± 0,61
D156N (3)	3,74 ± 0,04	n.g.

Tab. 3.8.25 τ -Werte der *off*-Kinetik nach Laserblitzanregung bei -75 mV. Der Abfall von I_P wurde mit monoexponentiellen Funktionen gefittet. Die Werte werden zusammen mit dem Standardfehler angegeben. (n: Mindestanzahl der Messungen, n.g.: nicht gemessen)

100 mM Na _e / -75 mV: Konstrukt (n)	pH _e 7,5 τ_{off} [s]	pH _e 4 τ_{off} [s]
C128T (4)	1,39 ± 0,21	0,61 ± 0,02
C128A (4)	30,9 ± 4,1	7,14 ± 1,42
D156N (3)	1,84 ± 0,23	n.g.

4. Diskussion

4.1 Der Mechanismus von ChR2-WT

Um den Einfluss von Mutationen auf die Ionenleitung zu erklären und daraus Rückschlüsse auf den Kanalmechanismus ziehen zu können, musste zunächst ein Modell für den Ionentransport aufgestellt werden. In Zusammenarbeit mit Prof. Dietrich Gradmann von der Universität Göttingen wurde ein Minimalmodell für die Leitung von Protonen und monovalenten Kationen entwickelt. Es beschreibt den Transport durch ChR2 als Überwindung einer intra- und einer extrazellulären Energiebarriere. Damit soll die Ionenleitung auf eine molekulare Grundlage gestellt und die Funktionen einzelner Aminosäuren aufgeklärt werden. Dieses Modell habe ich an die Strom/Spannungskurven vom Wildtyp und Mutanten angepasst.

Für die Beschreibung der Kinetiken der Stromspuren habe ich zunächst ein 4-Zustandsmodell verwendet, das ursprünglich von Prof. Gradmann für ChR1 aufgestellt wurde. Es beschreibt die Übergänge zwischen den leitenden und geschlossenen Zuständen des Kanals [28]. Ich habe dieses 4-Zustandsmodell mit einer modifizierten Variante verglichen, die von Katja Stehfest als Alternative für die Zustandsänderungen von ChR2 in Betracht gezogen wurde [59].

4.1.1 Ionenleitung in ChR2-WT

Es war nicht das Ziel dieser Studie ein exaktes Ionentransportmodell zu entwickeln. Stattdessen sollte ein Minimalmodell entstehen, das die wesentlichen Eigenschaften der *IV*-Kurven mit so wenigen Parametern wie möglich wiedergibt. Deshalb habe ich zunächst einige vereinfachende Annahmen gemacht.

Ca²⁺ und Mg²⁺ Permeabilität

Die Messungen mit bivalenten Kationen hatten zwar nur einen qualitativen Charakter, die keine Aussage über ihren absoluten Beitrag zum Gesamtstrom zulassen, aber es konnte gezeigt werden, dass beide Spezies den Natriumeinstrom hemmen. Im Gegensatz zu Mg²⁺ wurden Calciumionen in messbaren Mengen geleitet. Beim Wildtyp, T159C und H134R kam es in Abwesenheit von Natriumionen zu einer Steigerung des Einstroms, wenn die Calciumkonzentration außen anstieg (Abb. 3.1.9/ 10/ 11). Im Gegensatz dazu reduzierte sich der Ladungseinstrom, wenn das Außenmedium Na⁺ enthielt. Das bedeutet, dass der Natriumeinstrom durch Calciumionen geblockt wird. Die Messungen lassen darauf schließen, dass mono- und bivalente Kationen um die Bindungsstelle konkurrieren, diese aber eine höhere Affinität gegenüber bivalenten Ladungsträgern besitzt.

Die Permeabilität von Ca^{2+} ist vermutlich trotzdem kleiner als die von monovalenten Ionen, da das Umkehrpotential kaum von der extrazellulären Konzentration bivalenter Kationen abhing. Wenn die extrazelluläre Calciumkonzentration in NMG-Cl um das 100-fache stieg, änderte sich das Umkehrpotential nur um wenige Millivolt, bei H134R beispielsweise gerade von -27 mV auf -25 mV (Abb. 3.1.10 A). Das zeigt, dass der Kaliumausstrom hier einen wesentlich größeren Beitrag liefert. Die Ionenbindungsstelle muss auch eine hohe Affinität gegenüber Mg^{2+} besitzen, da hohe Magnesiumkonzentrationen den Einstrom verringerten. Anscheinend werden Magnesiumionen aber schlechter als Calciumionen geleitet, da es in NMG-Cl bei steigender Magnesiumkonzentration keine signifikante Zunahme des Einstroms gab. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei den vorliegenden Konzentrationen bivalenter Kationen von mindestens 0,1 mM bereits eine Sättigung an der Ionenbindungsstelle vorlag. Sicher ist, dass ChR2 in den durchgeführten Experimenten Protonen und monovalente Kationen sehr viel besser leitete als bivalente Kationen. Da deren Konzentrationen klein und immer gleich waren, habe ich sie vernachlässigt. Ohne die Berücksichtigung bivalenter Kationen, lieferte das Modell bereits sehr gute Resultate und hatte dabei den Vorteil, dass einige Parameter zur mathematischen Beschreibung des Ionentransports eingespart werden konnten.

Die Experimente mit variablen Konzentrationen bivalenter Ionen lieferten aber auch einen entscheidenden Hinweis zur Funktionsweise von ChR2, nämlich dass Ionen um die Bindungsstelle konkurrieren. Dieses Prinzip gilt auch, wie weiter unten veranschaulicht wird, für Na^+ , K^+ und Protonen.

Na^+ und K^+ Permeabilität im Vergleich zu Protonen

Eine weitere Vereinfachung für den Ionentransport ist, dass Na^+ und K^+ als eine Ionenspezies betrachtet werden, die hier mit M^+ bezeichnet wird. Diese Annahme kann unter der Voraussetzung gemacht werden, dass die Permeabilität beider Ionenspezies annähernd gleich ist. Da als zweiter Hauptladungsträger Protonen vorliegen, kann dies auch so definiert werden, dass die Permeabilität von K^+ und Na^+ gegenüber Protonen annähernd gleich ist. Für die Berechnung habe ich eine modifizierte Goldmanngleichung verwendet [60]:

$$V_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_H[H^+]_e + P_{Na}[Na^+]_e + P_K[K^+]_e}{P_H[H^+]_c + P_{Na}[Na^+]_c + P_K[K^+]_c}$$

In dieser Gleichung hängt das Umkehrpotential V_r von der extrazellulären und cytosolischen Ionenkonzentration ab und von der Permeabilität P der einzelnen Ladungsträger. Unter der Voraussetzung $P_{Na} = P_K$ gilt:

$$[M^+]_{e/c} = [Na^+]_{e/c} + [K^+]_{e/c}$$

$$\alpha = \frac{P_M}{P_H}$$

$$V_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]_e + \alpha[M^+]_e}{[H^+]_c + \alpha[M^+]_c}$$

Um zu zeigen, dass diese Annahme möglich ist, habe ich Na^+ im Außenmedium durch K^+ ersetzt. Bei pH_e 7,5/ -100 mV reduzierte sich dadurch der Einstrom um ca. 30% und das Umkehrpotential verschob sich von -7 auf -14 mV (Abb. 3.1.12). Beides deutet darauf hin, dass ChR2 Kaliumionen schlechter leitet als Na^+ . Die Konzentrationen beziehungsweise die Aktivitäten der cytosolischen Ladungsträger stammen aus der Literatur (Tab. 4.1.). Das Umkehrpotential für monovalente Kationen beträgt bei $[M^+]_c = 126$ mM und $[M^+]_e = 100$ mM etwa -5,9 mV. In der Literatur wird der cytosolischen pH-Wert von Oocyten mit 7,33 angegeben, was bei pH_e 7,5 einem Umkehrpotential von -10 mV für Protonen entspricht. Das gemessene Umkehrpotential von -14 mV bei $[\text{K}^+]_e = 100$ mM lässt aber eher einen pH_c von 7,2 vermuten. Mit diesem Wert und $[\text{Na}^+]_e = 100$ mM beträgt $\alpha = 3,7 \cdot 10^{-6}$. Bei 100 mM K^+ im Außenmedium ist α mit $1,8 \cdot 10^{-7}$ deutlich kleiner, was für die geringere Permeabilität von K^+ gegenüber Na^+ spricht. Der Literaturwert für den cytosolischen pH-Wert konnte nicht experimentell überprüft werden. Er hat jedoch bei pH_e 7,5 einen großen Einfluss auf den Betrag von α . Um mögliche Fehler zu minimieren, habe ich die Messung bei einem größeren Protonengradienten wiederholt. Bei pH_e 9 verschob sich das Umkehrpotential von $V_r = -31$ mV auf $V_r = -38$ mV nachdem Natrium- gegen Kaliumionen ausgetauscht wurden. Für Na_e / pH_e 9 wird $\alpha = 2,9 \cdot 10^{-7}$. Mit 100 mM Kaliumionen im Außenmedium wird $\alpha = 1,9 \cdot 10^{-7}$. Das heißt, hier sinkt die Permeabilität monovalenter Kationen gegenüber Protonen um das 1,6 fache. Das tatsächliche Verhältnis von P_{Na} zu P_{K} dürfte noch etwas größer sein, kann aber in Oocyten nicht bestimmt werden, da hierfür das Umkehrpotential mit gleichen Natriumkonzentrationen innen und außen gemessen werden müsste. Gegenüber der viel größeren Protonenselektivität des Kanals ist dieser Unterschied in erster Näherung vernachlässigbar.

Tab. 4.1 Intrazelluläre Ionenkonzentrationen von *Xenopus laevis* Oocyten [61]

	Na^+	K^+	Cl^-	Ca^{++}
Konzentration	~ 6 mM	~ 120 mM	~ 45 mM	~ 0,3 μM

Chlorid

Wenn sich in der extrazellulären Lösung 100 mM NaCl befanden, besteht ein nach innen gerichteter Gradient für Chloridionen, da deren intrazelluläre Aktivität etwa bei 45 mM liegt (Tab. 4.1.). Durch den Austausch von extrazellulärem Chlorid gegen Aspartat und Sulfat entstand ein nach außen gerichteter Chloridgradient. Unter der Bedingung, dass ChR2 Chlorid aber nicht Aspartat und Sulfat leiten kann, hätten die Stromamplituden bei -100 mV zunehmen und das Umkehrpotential positiver werden müssen. Stattdessen wurden die

Stromamplituden kleiner und das Umkehrpotential negativer (Abb. 3.1.13). Derselbe Effekt tritt auf, wenn die extrazellulären Natriumionen entfernt werden. Anscheinend kommt es durch Aspartat und Sulfat zu einer Inhibierung des Natriumeinstroms, deren Ursache in zukünftigen Experimenten nachgegangen werden muss. Mit hoher Sicherheit kann jedoch die Leitung von Anionen ausgeschlossen werden.

Ist ChR2 eine „leaky proton pump“?

Feldbauer et al. (2009) haben in ihrer Publikation eine aktive Pumpaktivität neben dem passiven Ladungstransport nachgewiesen [62]. In ChR2 sind einige der Aminosäuren konserviert, die in der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) am Pumpmechanismus beteiligt sind. Die Autoren nehmen daher an, dass bei ChR2 dieser Mechanismus konserviert ist und Protonen entgegen ihres Konzentrationsgradienten gepumpt werden. Sie vermuteten, dass dies Teil des Aktivierungsmechanismus von ChR2 ist. Als Nachweis wurde ein Membranstrom gezeigt, der bei 0 mV und fehlenden Ionengradienten auftrat. Leider fehlt in dieser Publikation eine quantitative Analyse dieses Effekts. So wurde beispielsweise nicht angegeben wie hoch der Anteil dieses Stroms im Vergleich zum passiven Kationenstrom ist. Außerdem wurde weder die pH- noch die Spannungsabhängigkeit dieses Stroms gemessen, wodurch eine eindeutigere Zuordnung als Pumpaktivität möglich gewesen wäre. Die Bezeichnung von ChR2 als *leaky proton pump* impliziert zumindest, dass der Protonenstrom einen relativ hohen Anteil am Gesamtstrom hat. Dieser Protonenstrom wäre dem passiven Strom unter nativen Bedingungen entgegengesetzt und würde zu einer Verminderung der Gesamtaktivität und zu einer negativen Verschiebung des Umkehrpotentials führen. Beides wäre kontraproduktiv für die eigentliche Funktion des Kanals, nämlich eine Depolarisation der Chlamydomonasmembran herbeizuführen.

Die in der vorliegenden Studie vorgenommenen Messungen, lassen jedenfalls keine Rückschlüsse auf einen Protonenstrom zu, der eine vergleichbare Größenordnung wie die passiven Kationenströme hat. Alle Messungen wiesen die typischen Charakteristika eines Ionenkanals auf, der in beide Richtungen Kationen und Protonen entlang ihren elektrophysiologischen Gradienten leitet. Dabei hingen die Umkehrpotentiale von der äußeren Kationen- und Protonenkonzentration ab. Bei elektrophysiologischen Messungen mit BR lag das Umkehrpotential der Pumpaktivität, bei pH_e -Werten zwischen 8,5 und 5,5, jenseits von -150 mV [13]. ChR2 hatte dagegen unter neutralen Bedingungen ein Umkehrpotential von -12 mV. Daher kann die Pumpaktivität, sofern vorhanden, nur einen geringen Anteil an der Gesamtaktivität haben und ich habe sie dementsprechend vernachlässigt (Abb. 3.1.3). Bei BR führten Mutationen in der Protonenleitungskette oft zu einer dramatischen Reduzierung der Aktivität (BR-D85A) [52]. Entsprechende Mutationen in ChR2 (E123A) hatten dagegen keine vergleichbaren Beeinträchtigungen zur Folge. Es ist daher fraglich, ob der Pumpmechanismus eine entscheidende Rolle spielt oder tatsächlich in Channelrhodopsinen konserviert ist.

4.1.2 *Two Barrier* Modell des Ionentransports

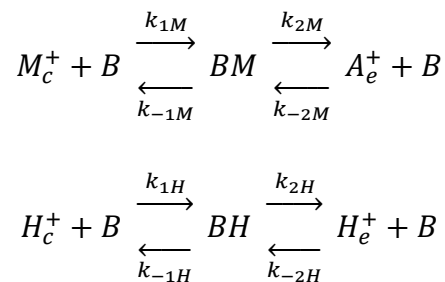
Für die weitere Modellentwicklung wird die Leitung von Ca^{2+} vernachlässigt und Na^+ und K^+ werden als eine Ionenspezies M^+ mit gleicher Permeabilität betrachtet. Das Pumpen von Protonen und die Leitung von Chlorid kann ausgeschlossen werden.

Mit dem Modell soll qualitativ der Einfluss der Mutationen auf die Protonen- und Kationentranslokation durch ChR2 diskutiert werden. Es muss die Konkurrenz der Ladungsträger um die Ionenbindungsstelle beinhalten, sowie die Einwärtsgleichrichtung und alle weiteren Charakteristika der *IV*-Kurven reproduzieren können. Damit soll das Modell auch zur Aufklärung der Funktion der mutierten Aminosäuren beitragen. Außerdem muss es für eine spätere, quantitative Analyse auch um die Parameter erweiterbar sein, die hier vernachlässigt wurden, d.h. Calciumleitfähigkeit, die unterschiedliche Permeabilität von Na^+ und K^+ und eine mögliche Inhibition durch Mg^{2+} .

Einen klassischen Ansatz liefert die Stromgleichung der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung. Sie reproduziert zwar auch Einwärtsgleichrichtung auf Grund von Konzentrationsgradienten, aber die resultierenden Strom/Spannungskurven überschneiden sich nicht unter variierenden Ionenkonzentrationen [60]. Als Grundannahme gilt hier, dass die Ionen unabhängig voneinander über die Membran fließen, was eine Konkurrenz um die Bindungsstelle ausschließt.

In Feldbauer et al. wurde vorgeschlagen, dass der Ionenstrom über eine asymmetrische Eyring-Barriere fließt [62]. Dadurch konnte die Einwärtsgleichrichtung des Natriumstroms auch unter äquimolaren Bedingungen beiderseits der Membran erklärt werden. Dieses Modell lässt aber auch die Konkurrenz um die Bindungsstelle außer Acht.

In dem *Two Barrier* Modell gehen wir von einer einfachen Ionenbindungsstelle B im Kanal aus, die entweder von einem Proton (H^+) oder einem monovalenten Kation (M^+) besetzt werden kann. Die Bindung des einen schließt die Bindung des anderen aus. Gebundene Ladungsträger können den Kanal auf beiden Seiten verlassen. Diese Vorgänge ähneln dem enzymatischen Substratumsatz nach Michaelis-Menten. Die Ionenbindungsstelle hat die Funktion eines Enzyms an das zwei Substrate binden können. Deren Transport, von einer Seite der Membran auf die andere, entspricht der Umwandlung der Substrate in Produkte. Dabei sind alle Schritte reversibel (Abb. 4.1.1):



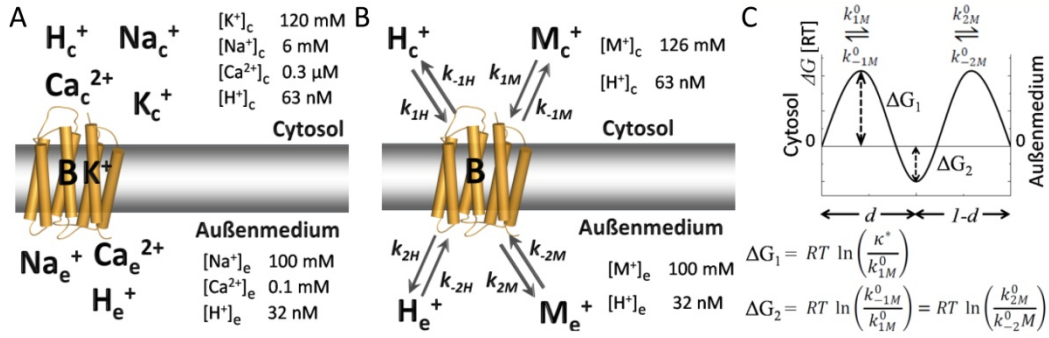


Abb. 4.1.1 Schematische Darstellung des Ionentransports mit dem Two Barrier Modell. **A** Die angegebenen Ionenkonzentrationen bzw. Aktivitäten im Cytosol und Außenmedium beziehen sich auf die Literaturwerte für Oocyten (Tab. 4.1) und die Referenzlösung (Na 7,5). Ionen konkurrieren um die Ionenbindungsstelle B von ChR2, die nur von einem Ladungsträger gleichzeitig besetzt werden kann. **B** Nach den vereinfachenden Annahmen bleiben nur Protonen (H^+) und monovalente Kationen (M^+) als Ladungsträger übrig, die mit den Geschwindigkeitskonstanten k an den Kanal binden und ihn wieder verlassen. **C** Energieprofil für den Transport von M^+ , dessen Höhe von den Basiskonstanten k^0 abhängt (k^0 : Transportrate unter Gleichgewichtsbedingungen bei 1 M, 0 mV). Die Überwindung von cytosolischer (ΔG_1) und extrazellulärer Energiebarriere fasst alle Vorgänge zusammen, die zum Erreichen und Verlassen der Ionenbindungsstelle potentiell notwendig sind, z.B. Dehydration der Ionen sowie elektrische und sterische Wechselwirkungen. Das Energieminimum (ΔG_2) repräsentiert die interne Ionenbindungsstelle (d : elektrische Distanz, $\kappa^* = 6,25 \cdot 10^{12}$).

Hier gilt $[M^+], [H^+] \gg [B]$, so dass die Ionenbindungsstelle im Gleichgewicht quasi immer besetzt ist. Je nach Blickrichtung können die extrazellulären Ladungsträger (M_e, H_e) als Substrat und die cytosolischen (M_c, H_c) als Produkte angesehen werden. Hat der Kanal gegenüber einem Ladungsträger eine hohe Affinität, ist dessen Bindungswahrscheinlichkeit hoch. Steigt die Konzentration eines Substrats, sinkt die Bindungswahrscheinlichkeit für die anderen Ladungsträger. Die zeitlichen Änderungen der jeweiligen Konzentration können durch ein System von Differentialgleichungen dargestellt werden:

$$\frac{dM_c}{dt} = -k_{1M} \cdot M_c \cdot B + k_{-1M} \cdot BM$$

$$\frac{dM_e}{dt} = -k_{-2M} \cdot M_e \cdot B + k_{2M} \cdot BM$$

$$\frac{dH_c}{dt} = -k_{1H} \cdot H_c \cdot B + k_{-1H} \cdot BH$$

$$\frac{dH_e}{dt} = -k_{-2H} \cdot H_e \cdot B + k_{2H} \cdot BH$$

$$\frac{dBH}{dt} = -k_{-1H} \cdot BH - k_{2H} \cdot BH + k_{1H} \cdot H_c \cdot B + k_{-2H} \cdot H_e \cdot B$$

$$\frac{dBM}{dt} = -k_{-1M} \cdot BM - k_{2M} \cdot BM + k_{1M} \cdot M_c \cdot B + k_{-2M} \cdot M_e \cdot B$$

$$\begin{aligned} \frac{dB}{dt} = & -k_{1H} \cdot H_c \cdot B - k_{-2H} \cdot H_e \cdot B - k_{1M} \cdot M_c \cdot B - k_{-2M} \cdot M_e \cdot B \\ & + k_{-1H} \cdot BH + k_{2H} \cdot BH + k_{-1M} \cdot BM + k_{2M} \cdot BM \end{aligned}$$

Dieses Differentialgleichungssystem ist nicht linear und kann nicht analytisch gelöst werden. Für den stationären Fall gilt jedoch unter der Voraussetzung $[M^+] , [H^+] \gg [B]$:

$$\frac{dBH}{dt} = 0, \quad \frac{dBM}{dt} = 0$$

Außerdem bleibt die Gesamtkonzentration des Kanals beziehungsweise der Ionenbindungsstelle immer konstant. Sie setzt sich aus der unbesetzten und der mit Protonen und Kationen besetzten Bindungsstelle zusammen:

$$B_{tot} = BH + BM + B$$

Für den Kationenstrom gilt dann beispielsweise:

$$\begin{aligned} I_M = ze \frac{dM_e}{dt} &= ze(B_{tot} - BH) \frac{M_c q - M_e}{k_{2M} + k_{-1M} + M_c k_{1M} + M_e k_{-2M}} \\ q &= \frac{k_{1M} \cdot k_{2M}}{k_{-1M} \cdot k_{-2M}} \end{aligned}$$

Aus dieser Gleichung geht hervor, dass die Konkurrenz um die Bindungsstelle eine inhärente Eigenschaft des Modells ist. Der Kationenstrom hängt von der Gesamtkonzentration des Kanals ab (B_{tot}), aber er wird kleiner, wenn durch eine hohe Protonenkonzentration die Anzahl unbesetzter Bindungsstellen sinkt ($B_{tot} - BH$). Da die Gesamtkonzentration von Chr2 in den Experimenten unbekannt ist, habe ich die Berechnungen für einen einzelnen Kanal durchgeführt. Für die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten, muss aber die Einzelkanalleitfähigkeit von Chr2 bekannt sein. Unter dieser Voraussetzung können die Konzentrationsangaben der Bindungsstelle durch die Besetzungswahrscheinlichkeiten von B ersetzt werden und es gilt:

$$1 = p_H + p_M + p_e$$

Dabei sind p_H , p_M und p_e die Wahrscheinlichkeiten eine mit Protonen, Kationen besetzte oder eine leere Bindungsstelle vorzufinden. Für den Kationenstrom eines einzelnen Kanals ergibt sich daraus:

$$I_M^{einzel} = ze \frac{dM_e}{dt} = ze(1 - p_H) \frac{M_c q - M_e}{k_{2M} + k_{-1M} + M_c k_{1M} + M_e k_{-2M}}$$

$$I_M = I_M^{einzel}(N_{ChR2})$$

N_{ChR2} ist dabei die Gesamtanzahl der verfügbaren ChR2 Moleküle. Bei Feldbauer et al. wird der stationäre Photostrom für einen einzelnen Kanal bei pH_e 7,5, 100 mM $[Na^+]_e$ und -100 mV mit 15 fA angegeben [62]. Dies entspricht einem Umsatz von ca. 10^5 Elementarladungen pro Sekunde. In Oocyten betrug der stationäre Strom unter diesen äußeren Bedingungen durchschnittlich -20 nA. Daraus ergibt sich eine Gesamtzahl von $N_{ChR2} = 1,33 \cdot 10^6$.

Wie bei der Michaelis Menten Kinetik sättigen die einzelnen Stromkomponenten bei hohen Konzentrationen auf einen Maximalstrom. Dessen Wert hängt auch von den Konzentrationen der anderen Substrate ab. Durch die Messung des Einstroms und Ausstroms eines Ladungsträgers bei verschiedenen Konzentrationen könnte man prinzipiell den k_m Wert für dessen intrazelluläre und extrazelluläre Bindung messen sowie die Abhängigkeit dieser Werte von den Konzentrationen anderer Ladungsträger bestimmen. Bei den vorliegenden Experimenten konnten jedoch nur die Außenkonzentrationen variiert und nicht zwischen Kationen und Protonenstrom unterschieden werden. Der gemessene Gesamtstrom setzt sich aus der Summe dieser Komponenten zusammen:

$$I = I_M + I_H = ze \left(\frac{dM_e}{dt} + \frac{dH_e}{dt} \right)$$

Da die Konzentrationen der Substrate bekannt sind, hängt die Stromamplitude von der Wahl geeigneter Geschwindigkeitskonstanten k ab. Nach der Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeit von Henry Eyring gilt ([60]):

$$k = S \exp \left(-\frac{E_a}{RT} \right)$$

Hierbei ist E_a die Aktivierungsenergie, S eine charakteristische Konstante der Reaktion, T die absolute Temperatur und R die universelle Gaskonstante. Da die Stromamplituden von den Konzentrationsgradienten und dem elektrischen Feld abhängen, müssen die Geschwindigkeitskonstanten konzentrations- und spannungsabhängig sein. Nach [63] gilt für das obige Gleichungssystem:

$$k_{1M} = k_{1M}^0 \cdot M_c \cdot \exp \left(\frac{E \cdot d \cdot u}{2} \right)$$

$$k_{-1M} = k_{-1M}^0 \cdot \exp \left(-\frac{E \cdot d \cdot u}{2} \right)$$

$$k_{2M} = k_{2M}^0 \cdot \exp\left(\frac{E \cdot (1 - d) \cdot u}{2}\right)$$

$$k_{-2M} = k_{-2M}^0 \cdot M_e \cdot \exp\left(\frac{E \cdot (d - 1) \cdot u}{2}\right)$$

$$u = \frac{F}{R \cdot T}$$

E ist hierbei die Membranspannung, F die Faraday-Konstante und d die elektrische Distanz. Die elektrische Distanz darf nicht mit der physischen Länge des Ionenkanals verwechselt werden. Vielmehr gibt sie den Grad des Spannungsabfalls zwischen verschiedenen Punkten in der Membran wieder. Da dies für ChR2 nicht bestimmt werden konnte, gehe ich hier von symmetrischen Bedingungen mit $d = 0,5$ aus. Das heißt, dass das elektrische Feld im ChR2-Modell gleichmäßig abfällt. Die Basiskonstanten k^0 beziehen sich auf eine Konzentrationen von 1M auf beiden Seiten der Membran und eine Spannung von 0 mV. Unter diesen Bedingungen liegt kein elektrochemischer Gradient vor und damit auch kein messbarer Nettostrom. Die Einheit der Basiskonstanten ist s^{-1} . Nach der Interpretation dieses Modells müssen die Ionen sowohl intra- als auch extrazellulär eine Energiebarriere überwinden, um an der Ionenbindungsstelle in ein Energieminimum zu fallen [64]. Die Höhe der Energiebarrieren (ΔG) zwischen zwei Punkten bedingt die Transportrate zwischen diesen Punkten und es gilt [60]:

$$k^0 = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)$$

Wobei k_B die Boltzmann-Konstante und h das plancksche Wirkungsquantum sind. Je größer die Energiebarrieren sind, umso langsamer werden die Übergänge. Die Höhe der Barriere wird durch die Differenz zwischen dem Ausgangsniveau und dem zu überwindenden Energiemaximum festgelegt. Außerhalb des Kanals liegt das Energieniveau per Definition bei 0 (Abb. 4.1.1). Die Höhe des intra- und extrazellulären Energiemaximums beträgt jeweils:

$$RT \ln\left(\frac{\kappa^*}{k_1^0}\right), \quad RT \ln\left(\frac{\kappa^*}{k_{-2}^0}\right)$$

mit $\kappa^* = k_B T/h \approx 6,25 \cdot 10^{12}$ bei $T = 300$ K. Bei ChR2 findet kein aktiver Transport statt. Stattdessen fließen die Ionen passiv über die Membran. Deshalb muss bei gleicher Ionenkonzentration innen und außen und bei 0 mV der Nettostrom null sein und wir können im Gleichgewicht folgende Beziehung voraussetzen [63]:

$$\frac{k_{-1}^0}{k_1^0} = \frac{k_2^0}{k_{-2}^0}$$

Das Energieminimum an der Ionenbindungsstelle beträgt dann:

$$RT \ln \left(\frac{k_{-1}^0}{k_1^0} \right) = RT \ln \left(\frac{k_2^0}{k_{-2}^0} \right)$$

Für die Ionenleitung lassen sich daraus einige allgemeine Annahmen ableiten. Die Anzahl geleiteter Ionen hängt auch von der größten Energiebarriere ab, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Die Einwärtsgleichrichtung resultiert aus unsymmetrischen Energiebarrieren. Zum Beispiel kann auch beim Fehlen jeglicher elektrochemischer Gradienten (beidseitig 1 M und 0 mV), die intrazelluläre Barriere für Kationenstroms höher sein als die extrazelluläre. Damit wäre der Übergang in das Cytosol langsamer als der in Richtung Außenmedium. Im Gleichgewicht ist der messbare Nettostrom aus thermodynamischen Gründen trotzdem null. Aus den Gleichungen für die Geschwindigkeitskonstanten k geht hervor, dass bei einer negativen Spannung der nach innen gerichtete Transport zunimmt, während der Transport nach außen abnimmt und es gilt unter äquimolaren Bedingungen:

$$\begin{aligned} k_{-2M} &> k_{-2M}^0 \\ k_{-1M} &> k_{-1M}^0 \\ k_{1M} &< k_{1M}^0 \\ k_{2M} &< k_{2M}^0 \end{aligned}$$

Umgekehrt gilt bei einer positiven Spannung:

$$\begin{aligned} k_{-2M} &< k_{-2M}^0 \\ k_{-1M} &< k_{-1M}^0 \\ k_{1M} &> k_{1M}^0 \\ k_{2M} &> k_{2M}^0 \end{aligned}$$

Wenn die intrazelluläre Barriere für den Kationentransport höher ist als die extrazelluläre, kann das mit folgender Beziehung zusammenhängen:

$$k_{1M}^0 < k_{-2M}^0$$

Daher wird unter äquimolaren Bedingungen, bei einer Spannung von -100 mV, k_{-2M} größer sein als k_{1M} bei +100 mV. Daraus resultiert die Einwärtsgleichrichtung, da bei -100 mV mehr Ladungen in die Zelle fließen als bei +100 mV aus ihr heraus.

Die Geschwindigkeitskonstanten unter bestimmten äußeren Bedingungen bestimmen die Transportraten der Ladungsträger und damit die Höhe der Stromamplituden. Das Energieprofil unter Gleichgewichtsbedingungen, dass aus den Basiskonstanten k^0 gebildet wurde, gibt eine bildliche Vorstellung davon, wie sich die Transportraten bei verschiedenen Spannungen und Ionenkonzentrationen

entwickeln. Um geeignete Basiskonstanten zu finden, die die spannungsabhängigen Stromamplituden bei verschiedenen extrazellulären Ionenkonzentrationen und pH_e -Werten wiedergeben, habe ich das Modell rechnergestützt an die Messwerte angepasst. Unter den Gleichgewichtsbedingungen

$$d\text{BH}/dt = 0, d\text{BM}/dt = 0$$

sowie mit

$$\frac{k_{-2M}^0}{k_{2M}^0} = \frac{k_{1M}^0}{k_{-1M}^0}$$

$$\frac{k_{-2H}^0}{k_{2H}^0} = \frac{k_{1H}^0}{k_{-1H}^0}$$

ergibt sich für den Gesamtstrom:

$$I_{\text{Ges}} = I_H + I_M$$

$$= ze(N_{\text{ChR2}}) \cdot f(E, M_e, M_c, H_c, H_e, k_{-1M}^0, k_{1M}^0, k_{-2M}^0, k_{-1H}^0, k_{1H}^0, k_{-2H}^0)$$

Hier ist e die elektrische Elementarladung. Die vollständige Gleichung, die für die Berechnung verwendet wurde, findet sich im Anhang. Der Gesamtstrom ist nach dieser Gleichung nur von den berücksichtigten Parametern abhängig. Die Werte für die Spannung sowie Außen- und Innenkonzentrationen der Ladungsträger sind aus den experimentellen Bedingungen und der Literatur bekannt (Tab. 4.1). Die Anpassung des *Two Barrier* Modells an die gemessenen Stromamplituden ergab ein Satz von sechs Geschwindigkeitskonstanten k^0 . Daraus konnte das Energieprofil unter Gleichgewichtsbedingungen berechnet werden. Wegen der oben genannten Vereinfachungen sind die Geschwindigkeitskonstanten nur qualitativ und geben die Stromamplituden deswegen nicht in jedem Fall zu 100 % wieder. Hier zeigen sich aber auch die Vorteile des reduzierten Systems, das mit 6 Parametern für die Protonen und Kationenleitung verwertbare Aussagen über den ChR2 Mechanismus ermöglicht. Die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten erfolgte nach der *least squares* Methode. Es bestand die Möglichkeit, dass die berechneten Parameter nicht das globale Minimum des Fits darstellen. Tatsächlich können mehrere Kombinationen unterschiedlicher k^0 Werte die experimentellen Daten wiedergeben. Als Einschränkung habe ich nur rationale und positive Werte zugelassen. Außerdem müssen alle Konstanten kleiner als der Wert des thermischen Rauschens sein ($\kappa^* = 6,25 \cdot 10^{12}$), der Protonentransport zur Bindungsstelle muss schneller als die Kationenbindung erfolgen und es muss dort ein Energieminimum vorliegen.

Beim *Two Barrier* Ansatz gibt es nur eine Ionenbindungsstelle. Tatsächlich wird es in ChR2 aber mehrere davon geben. Allerdings kann das Modell zukünftig durch

beliebig viele Bindungsstellen erweitert und die Transportprozesse damit genauer wiedergegeben werden.

4.1.3 Charakterisierung von zwei leitenden Zuständen

Das 4-Zustandsmodell, das die Stromspuren von ChR2 am besten beschreibt, beinhaltet zwei leitende Zustände (Abb. 4.1.2 A, [28]). Allerdings gab es dafür bisher keine experimentellen Belege. Mir ist es gelungen, einen elektrochemischen Nachweis für die Existenz von mindestens zwei leitenden Zuständen (O1, O2) zu erbringen. Als Voraussetzung müssen sie unterschiedliche Ionenselektivitäten und damit unterschiedliche Umkehrpotentiale besitzen. Um diese messen zu können, muss der Kanal die leitenden Zustände zu verschiedenen Zeitpunkten in unterschiedlichen Mengen bevölkern. Nach dem 4-Zustandsmodell befindet sich der Kanal im Dunkeln vollständig in C1. Nach der Aktivierung bevölkert ein Großteil der Moleküle den ersten leitenden Zustand O1. Daher repräsentiert der Anfangsstrom I_0 fast vollständig den Ionentransport durch O1 (Abb. 4.1.2-B). Bei einer kontinuierlichen Anregung stellt sich ein Gleichgewicht zwischen leitenden und nichtleitenden Zuständen ein, wobei der Anteil von O2 zunimmt. Ob sich die Umkehrpotentiale von I_S und I_0 unterscheiden, hängt daher auch vom O2 Anteil am stationären Strom ab.

Das Schlüsselexperiment fand bei pH_e 9 mit 100 mM NaCl im Außenmedium statt. Hier sah man, dass das Umkehrpotential von I_0 etwa 12 mV positiver war als das von I_S (Abb. 3.1.3-C). Unter diesen Bedingungen wird durch die unterschiedlichen pH-Werte von Cytosol ($\sim 7,3$) und Außenmedium ein starker Protonengradient aufgebaut. Dadurch ergibt sich für Protonen ein Umkehrpotential von -106 mV. Der gemessene Wert hatte sich bei pH_e 9 gegenüber pH_e 7,5 deutlich negativ verschoben. Das Umkehrpotential für monovalente Kationen liegt bei beiden pH_e -Werten bei -6 mV. Die pH_e -abhängige Verschiebung von V_r spricht also für einen Beitrag durch ausströmende Protonen. Die Strom/Spannungsmessungen bei pH_e 9 ergaben jedoch auch, dass das Umkehrpotential von I_0 mit -19 mV näher bei -6 mV lag als das von I_S ($V_r = -31$ mV). Zu Beginn einer Aktivierung (I_0) bevölkert der Kanal fast ausschließlich O1, während der Anteil von O2 erst bei anhaltender Belichtung zunimmt (Abb. 4.1.7). Dessen Beitrag zum stationären Strom betrug bei pH_e 9 etwa 30%. Da in der Anfangsphase offensichtlich mehr Kationen geleitet werden als in der stationären Phase, muss O1 eine höhere Kationenselektivität aufweisen als O2. Dieses Ergebnis wurde von Matthias Prigge durch *Voltage Clamp* Messungen an HEK-Zellen bestätigt.

Für eine quantitative Aussage über die Ionenselektivität mussten aber auch bivalente Kationen berücksichtigt werden, die gerade bei pH_e 9 in Abwesenheit von Na^+ einen hohen Anteil am Einstrom erreichen können [65]. Damit scheidet eine Berechnung über die Goldmanngleichung aus, da hier alle berücksichtigten Ionen die gleiche Valenz haben müssen. Stattdessen wurde ein enzymatischer Ansatz gewählt, der komplett von Prof. Dietrich Gradmann entwickelt wurde. Die Berechnung der Ionenselektivität erfolgte mit dem sogenannten *Reorientation-*

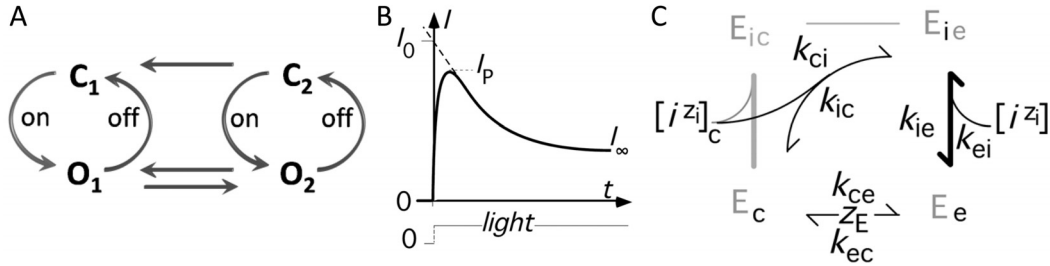


Abb. 4.1.2 Reorientation Modell zur Berechnung der Ionenselektivitäten. **A** Das 4-Zustandsmodell zur Simulation der Photoströme beinhaltet zwei leitenden Zustände O1 und O2. Im Dunkeln befindet sich der Kanal vollständig in C1 (nach [65]). **B** Unmittelbar nach der Lichtanregung bevölkert ein Großteil der Moleküle O1. Da beim transienten Strom (I_P) bereits ein Teil in den zweiten Zyklus übergegangen ist, stellt die lineare Approximation der Inaktivierung auf $t = 0$ eine Näherung des Ionentransports durch O1 dar (I_0). Der stationäre Strom (I_S) bildet dagegen den Gleichgewichtszustand unter kontinuierlicher Belichtung ab und setzt sich aus den Beiträgen von O1 und O2 zusammen. Wenn O1 und O2 unterschiedliche Ionenselektivitäten besitzen, können sie elektrochemisch, durch die verschiedenen Umkehrpotentiale von I_0 und I_S charakterisiert werden. **C** *Reorientation* Modell: Die Bindungsstelle des Kanals (E) orientiert sich entweder zur cytosolischen (c) oder extrazellulären (e) Seite. Sie trägt die Ladung z_E und kann in einem schnellen Gleichgewicht das Ion i binden. Die besetzte Bindungsstelle (E_{ic} , E_{ie}) ändert die Orientierung und entlässt das Ion auf der anderen Seite. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen kann der Transport von E_{ie} und die cytosolische Bindung zusammengefasst werden. Das vereinfachte Modell umfasst dadurch nur die mit schwarzen Pfeilen gekennzeichneten Übergänge zwischen den Zuständen E_{ie} , E_c , E_e (Entnommen aus [65], nähere Erläuterungen im Text).

Modell (Abb. 4.1.2-C). Es unterscheidet sich vom *Two Barrier* Ansatz in einigen Punkten und wird deshalb nachfolgend näher erläutert.

Als Vereinfachung wurden zunächst die monovalenten und bivalenten Kationen jeweils zu einer Ionenspezies zusammengefasst:

$$[M^+]_{e/c} = [Na^+]_{e/c} + [K^+]_{e/c}$$

$$[D^{2+}]_{e/c} = [Mg^{2+}]_{e/c} + [Ca^{2+}]_{e/c}$$

Die dritte Ionenspezies stellen Protonen (H^+) dar. In Abb. 4.1.3 wird das Modell, das aus insgesamt 4 Zuständen besteht, veranschaulicht. Die leere Bindungsstelle (E) trägt die Ladung z_E und orientiert sich entweder zur cytosolischen (E_c) oder zur extrazellulären Seite (E_e). Ein Ladungsträger i , mit der Ladung z_i bindet in einem schnellen Prozess an die leere Bindungsstelle, woraus je nach Orientierung der Komplex E_{ic} oder E_{ie} hervorgeht. Dieser wird in einer vergleichsweise langsamen Reaktion, durch die Reorientierung der Bindungsstelle, über die Membran transportiert. Die besetzte Bindungsstelle entlässt den Ladungsträger dann auf der jeweils anderen Seite.

Die Fluktuation der leeren Bindungsstelle kann als Transport der Ladung z_E über eine einfache Eyring-Barriere dargestellt werden. Für den Übergang von der cytosolischen (c) zur extrazellulären Seite (e) und umgekehrt gilt jeweils:

$$k_{ce} = k_{ce}^0 \cdot \exp\left(\frac{+z_E \cdot E \cdot u}{2}\right)$$

$$k_{ec} = k_{ec}^0 \cdot \exp\left(\frac{-z_E \cdot E \cdot u}{2}\right)$$

$$u = \frac{F}{R \cdot T}$$

F bezeichnet hierbei die Faraday-Konstante, R die universelle Gaskonstante und T steht für die absolute Temperatur. Die Geschwindigkeitskonstanten hängen wie beim *Two Barrier* Modell exponentiell von der Spannung E ab. Deshalb gilt die Basiskonstante k^0 für den Transport bei $E = 0$ mV. Wenn die cytosolischen Protonen- und Ionenkonzentrationen unverändert bleiben, kann der Transport der besetzten Bindungsstelle und die cytosolische Bindung von i zu einer Reaktion zusammengefasst werden. Daher kann für die Modellierung des Iontentransports das *Reorientation* Modell von vier auf drei Zustände reduziert werden, da bei den Messungen mit Oocyten nur die extrazellulären Ionenkonzentrationen und pH-Werte variiert wurden. (Abb. 4.1.2 C). Für den Transport der besetzten Bindungsstelle ergeben sich folgende Geschwindigkeitskonstanten:

$$k_{ci} = k_{ci}^0 \cdot [i]_c \cdot \exp\left(+\frac{(z_E + z_i) \cdot E \cdot u}{2}\right)$$

$$k_{ic} = k_{ic}^0 \cdot \exp\left(-\frac{(z_E + z_i) \cdot E \cdot u}{2}\right)$$

Die Basiskonstanten k^0 entsprechen den Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen, dass heißt bei $E = 0$ mV und $[i]_{c/e} = 1$ M. Unter der Voraussetzung, dass die Bindung außen schneller erfolgt als der Transport der Ladungsträger ($k_{ei}, k_{ie} \gg k_{ci}, k_{ic}, k_{ec}, k_{ce}$), gilt für die extrazelluläre Bindung im Gleichgewicht:

$$K_i = \frac{k_{ei}}{k_{ie}}$$

$$K_i = \frac{k_{ei}^0 \cdot [i]_e}{k_{ie}^0} = K_i^0 \cdot [i]_e$$

Da bei fehlenden elektrochemischen Gradienten per Definition kein Strom fließen darf, gilt außerdem:

$$K_i^0 = \frac{k_{ec}^0 \cdot k_{ci}^0}{k_{ic}^0 \cdot k_{ce}^0}$$

Hierbei muss noch einmal betont werden, dass es sich beim *Reorientation* Ansatz um ein zyklisches Modell handelt und ein Molekül immer nur in einem Zustand gleichzeitig existiert. Um den Ladungstransport mathematisch beschreiben zu können, muss die Wahrscheinlichkeit bekannt sein, mit der sich die leere Bindungsstelle auf cytosolischer (p_c) oder extrazellulärer Seite befindet (p_e) sowie die Wahrscheinlichkeit einer mit der Ionenspezies i besetzten, nach außen orientierten Bindungsstelle (p_i). Da die einzelnen Zustände in Form eines geschlossenen Zyklus ineinander übergehen können, kann der King-Altman Mechanismus [66] angewendet werden und es gilt:

$$p_c = \frac{k_{ec} + \sum k_{ic} \cdot K_i}{(k_{ec} + \sum k_{ic} \cdot K_i) + (k_{ce} + \sum k_{ci}) + (\sum K_i \cdot (k_{ce} + \sum k_{ci}))}$$

$$p_e = \frac{k_{ce} + \sum k_{ci}}{(k_{ec} + \sum k_{ic} \cdot K_i) + (k_{ce} + \sum k_{ci}) + (\sum K_i \cdot (k_{ce} + \sum k_{ci}))}$$

$$p_i = \frac{K_i \cdot (k_{ce} + \sum k_{ci})}{(k_{ec} + \sum k_{ic} \cdot K_i) + (k_{ce} + \sum k_{ci}) + (\sum K_i \cdot (k_{ce} + \sum k_{ci}))}$$

Der Membranstrom setzt sich aus dem Transport der Ladung z_E der unbesetzten Bindungsstelle (I_E) und dem Transport der einzelnen Ionen-Kanal-Komplexe (I_i) zusammen und es gilt:

$$I_E = e \cdot z_E (p_c \cdot k_{ce} - p_e \cdot k_{ec})$$

$$I_i = e \cdot (z_E + z_i (p_c \cdot k_{ce} - p_i \cdot k_{ic}))$$

$$I = I_E + \sum I_i$$

Hierbei bezeichnet e die elektrische Elementarladung. Mit diesem Modell könnten prinzipiell, wie mit dem *Two Barrier* Ansatz die Basiskonstanten k^0 berechnet werden, die die experimentellen Strom/Spannungskurven wiedergeben. Für die Berechnung der Transportraten aus den Umkehrpotentialen gilt jedoch $I = 0$, woraus folgt:

$$\left\{ k_{ce}^0 + \sum \left(k_{ci}^0 [i]_e \exp \left(-\frac{z_i \cdot E \cdot u}{2} \right) \right) \right\} \left\{ k_{ce}^0 + \sum \left(z_i k_{ci}^0 [i]_c \exp \left(\frac{z_i \cdot E \cdot u}{2} \right) \right) \right\} = \\ \left\{ k_{ce}^0 + \sum \left(k_{ci}^0 [i]_c \exp \left(\frac{z_i \cdot E \cdot u}{2} \right) \right) \right\} \left\{ k_{ce}^0 + \sum \left(z_i k_{ci}^0 [i]_c \exp \left(-\frac{z_i \cdot E \cdot u}{2} \right) \right) \right\}$$

Die genaue Herleitung, die auf Prof. Gradmann zurückgeht, findet sich in [65]. Diese Gleichung ist nun unabhängig von z_E , k_{ic}^0 und k_{ec}^0 und kann für die Berechnung der Ionenselektivität verwendet werden. Die Valenzen und

Konzentrationen der Ionenspezies i sind bekannt. Die Spannung E , bei der $I = 0$ wird, kann den Strom/Spannungskurven entnommen werden. Durch die Variation der extrazellulären Ladungsträgerkonzentrationen konnten die Basiskonstanten für den Transport von monovalenten und bivalenten Kationen (k_{CM}^0 , k_{CD}^0), Protonen (k_{CH}^0), sowie für die Reorientierung der leeren Bindungsstelle (k_{ce}^0) berechnet werden. Das Ziel war es, quantitative Aussagen über das Verhältnis der Permeabilität von verschiedenen Ladungsträgern zueinander zu treffen. Dies konnte nun mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten für den Ionentransport geschehen. Für das Verhältnis der Permeabilität von Protonen (α) und divalenten Kationen (β) zu monovalenten Kationen gilt:

$$\alpha = \frac{k_{CH}^0}{k_{CM}^0}$$

$$\beta = \frac{k_{CD}^0}{k_{CM}^0}$$

Da sich die Umkehrpotentiale von I_0 und I_S unterscheiden, konnte damit die Ionenselektivität während der Anfangsphase und der stationären Phase berechnet werden (Tab. 4.2). Die Berechnungen, die vollständig von Prof. Gradmann durchgeführt wurden, ergaben für α_0 einen Wert von $3 \cdot 10^6$. In der stationären Phase nahm dieser Wert um mehr als das doppelte zu ($\alpha_S = 8,6 \cdot 10^6$), was für eine Zunahme der Protonenleitung im photostationärem Gleichgewicht spricht. Dagegen nahm der Transport von bivalenten Kationen ab ($\beta_0 = 5,5 \cdot 10^{-3}$, $\beta_S = 2,7 \cdot 10^{-3}$). Dieses Resultat bestätigt den vermuteten geringen Anteil von bivalenten Kationen am Gesamtstrom und damit auch die berechnete Vernachlässigung bei einer qualitativen Betrachtung.

Unter der Annahme, dass I_0 größtenteils die Ionenleitung durch O1 darstellt, geben α_0 und β_0 die Ionenselektivität dieses Zustands wieder. Im Gegensatz dazu bilden α_S und β_S die Selektivität im Gleichgewicht und nicht direkt von O2 ab. Trotzdem lässt sich daraus ableiten, dass O2 eine höhere Protonenselektivität und geringere Leitfähigkeit für bivalente Kationen hat als O1.

Tab. 4.2 Relative Ionenselektivität von ChR2 nach dem Reorientation Modell, abgeleitet aus den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten (k^0) für deren Transport. Entnommen aus [65]) (Messungen an HEK Zellen von Matthias Prigge).

	HEK cells	<i>Xenopus</i> oocytes
α_0	$4.5 \times 10^6 \pm 15\%$	$3.0 \times 10^6 \pm 8\%$
α_∞	$6.5 \times 10^6 \pm 16\%$	$8.6 \times 10^6 \pm 13\%$
α_0/α_∞	$0.71 \pm 2\%$	$0.36 \pm 6\%$
β_0	$18 \times 10^{-3} \pm 28\%$	$5.5 \times 10^{-3} \pm 29\%$
β_∞	$12 \times 10^{-3} \pm 31\%$	$2.7 \times 10^{-3} \pm 37\%$
β_0/β_∞	$1.56 \pm 6\%$	$2.2 \pm 6\%$

4.1.4 *Two Barrier* Modell für ChR2-WT

Eine der auffälligsten Eigenschaften von ChR2-WT ist die hohe Protonenselektivität, die sich u.a. durch ein stark vom pH_e -Wert abhängiges Umkehrpotential äußerte. Des Weiteren blieben die Stromamplituden bei pH_e 4 unverändert nachdem die Natriumionen aus der Messlösung entfernt wurden (Abb. 3.1.1). Das bedeutet, dass hier ein Großteil des Einstroms von Protonen getragen wurde. Der Protoneneinstrom war bei pH_e 4 so groß, dass er ausströmende Kationen überlagerte und kein Nettoausstrom bei +50 mV gemessen werden konnte. Demgegenüber stand die schwache Zunahme oder teilweise sogar die Abnahme des Einstroms von Ladungsträgern in der Anfangsphase (I_0), bei zunehmender Protonenkonzentration im Außenmedium (Abb. 3.1.2). Aus den Messungen des Umkehrpotentials wissen wir, dass ChR2 mindestens zwei leitende Zustände mit unterschiedlichen Ionenselektivitäten hat (Abb. 3.1.3). Dabei stellte sich heraus, dass während der stationären Phase eine höhere Protonenselektivität vorlag (Kap. 4.1.3). Das erklärt zum Teil, warum es bei I_s im Gegensatz zu I_0 eine stetige Zunahme des Einstroms bei sinkenden pH_e -Werten gab. Es erklärt aber nicht, warum der Anfangsstrom in NaCl bei pH_e 6 abnahm. Durch die Messungen mit variierenden Calcium- und Magnesiumkonzentrationen wurde klar, dass monovalente und bivalente Kationen um die Ionenbindungsstelle konkurrieren. Offensichtlich können bivalente Kationen den Natriumstrom blockieren, da es bei hohen Calcium- und Magnesiumkonzentrationen und mit Na^+ im Außenmedium zu einer Abnahme des Einstroms kam (Abb. 3.1.9). Augenscheinlich hat ChR2 eine hohe Affinität gegenüber Ca^{2+} und Mg^{2+} , wobei deren Transportraten vergleichsweise klein sind. Dieses Prinzip lässt sich auch auf Protonen und Na^+ übertragen, wobei der Kanal eine höhere Affinität gegenüber Protonen haben muss. Sie haben anscheinend eine vergleichsweise lange Verweildauer an der Bindungsstelle, wodurch ihre absolute Permeabilität klein wird. Dadurch kann der Anteil gebundener Protonen im Vergleich zu ihrer Konzentration sehr groß werden. Deshalb war das Umkehrpotential auch stark vom pH_e -Wert abhängig, denn der Protonenanteil nahm mit sinkendem pH_e -Wert stetig zu. Dabei wurden mehr Natriumionen geblockt, weil der Kanal ihnen gegenüber eine geringere Affinität hat. Sie müssen aber auch eine höhere Permeabilität beziehungsweise Transportrate als Protonen haben. Dies würde die Abnahme des I_0 -Einstroms bei pH_e 6 erklären. Obwohl der Anteil des Protonenstroms hier bei 65% lag, strömten weniger Ladungsträger in die Zelle als bei pH_e 9. Der Einstrom von Ladungsträgern nahm ab, weil der Protonentransport offensichtlich langsamer ist als der von Kationen. Das Konkurrenzprinzip ist ein wesentlicher Bestandteil des *Two Barrier* Ansatzes. Die Modellierung der Strom/Spannungskurven sollte die Bindungswahrscheinlichkeit und die Permeabilität von Protonen und Kationen verdeutlichen. Vermutlich hängt aber das O1/O2 Gleichgewicht vom pH_e -Wert und der Membranspannung ab. Da der stationäre Strom eine Mischung aus den beiden Offenzuständen darstellt, kann ein pH_e und spannungsabhängiges Gleichgewicht zwischen ihnen einen zusätzlichen Einfluss auf die Höhe des stationären Stroms haben. Um diesen Faktor zu minimieren, habe ich nur den Anfangsstroms I_0 für die

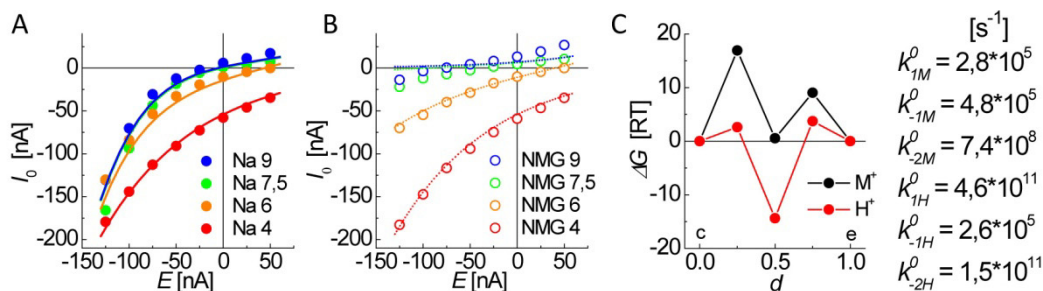


Abb. 4.1.3 Modellierung der IV-Kurven von Chr2-WT mit dem Two Barrier Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die modellierten Werte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte, wurden für die Modellierung mit -20 nA multipliziert, da dies der experimentelle I_S Durchschnittswert vom Wildtyp bei Na_e / pH_e 7,5/ -100 mV war. **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von Chr2-WT im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Die Transportraten von monovalenten Kationen (M^+) aus dem Cytosol (k_{1M}) und Außenmedium (k_{-2M}) zur Bindungsstelle sind kleiner als die für Protonen (H^+) (k_{1H} , k_{-2H}). Dies spiegelt sich in den unterschiedlichen Höhen der Eintrittsbarrieren für M^+ (schwarz) und H^+ (rot) wieder. Die Transportrate von der Bindungsstelle ins Cytosol ist für M^+ fast doppelt so groß wie für H^+ ($k_{-1M} > k_{-1H}$). Wegen der niedrigeren Eintrittsbarriere ($k_{-2H} > k_{-2M}$) ist die Besetzungswahrscheinlichkeit von Protonen dennoch höher und ihr Anteil am Einstrom steigt bei sinkendem pH_e . Da deren Weiterleitung ins Cytosol aber langsamer verläuft als für M^+ , ist die Zunahme des Gesamteinstroms relativ schwach.

Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten des Ladungstransports verwendet, da dieser zum Großteil den ersten Offenzustand O1 repräsentiert (Abb. 4.1.2). Für die Innenkonzentration von Protonen wurde ein intrazellulärer pH-Wert von 7,2 ($[H^+]_c = 6,3 \cdot 10^{-8}$ M) angenommen. Wegen der geringeren Permeabilität von Kaliumionen im Vergleich zu Natriumionen habe ich statt mit $[M^+]_c = 0,126$ M ($[Na^+]_c = 0,06$ M, $[K^+]_c = 0,12$ M) mit $[M^+]_c = 0,1$ M gerechnet.

Die simulierten IV-Kurven gaben die tatsächlichen Messdaten in NaCl sehr gut wieder (Abb. 4.1.3). Sowohl die Einwärtsgleichrichtung als auch die schwache pH_e -Abhängigkeit des Einstroms konnten reproduziert werden. Allerdings fand die Überschneidung der Kurven nicht im experimentellen Spannungsbereich, sondern erst bei ca. -150 mV statt. Dagegen gab es im positiven Bereich keine Überschneidungen und der Nettoausstrom nahm bei zunehmender Protonenkonzentration stetig ab. Dabei verschoben sich die Umkehrpotentiale immer weiter in Richtung positiver Werte.

Bei pH_e 9 und pH_e 7,5 wurde der modellierte Einstrom in NMG-Cl gegenüber NaCl stark reduziert. Bei pH_e 6/ -100 mV betrug der Anteil des Protonenstroms 50% und stieg bei pH_e 4 auf 100%, was gut mit den experimentellen Daten übereinstimmt. Bei +50 mV blieben die Amplituden gegenüber NaCl unverändert. Außerdem verschoben sich die Umkehrpotentiale bei pH_e 9 und pH_e 7,5 ohne Na^+ im Außenmedium in Richtung negativer Werte. Dagegen war V_r bei pH_e 6 in NaCl und NMG-Cl gleich, was auch mit den experimentellen Beobachtungen übereinstimmt. Allerdings ergaben sich durch die Vereinfachungen einige offensichtliche Abweichungen zu den experimentellen Daten. Zunächst waren die IV-Kurven bei pH_e 7,5 und 9 in NaCl annähernd gleich. Bei pH_e 9/ +50 mV war die Amplitude des Ausstroms zu klein und das Umkehrpotential zu positiv gegenüber den

experimentellen Daten. Unter neutralen und basischen Bedingungen war die Abnahme des Einstroms in NMG-Cl wesentlich stärker als in der Realität, wodurch die Umkehrpotentiale zu weit in Richtung negativer Werte verschoben wurden. Ein Teil der Abweichungen kann durch die nicht berücksichtigte Calciumionen erklärt werden, die bei NMGe 9 und NMGe 7,5 in die Zelle fließen. Der schwache Ausstrom bei NMGe 9/ +50 mV könnte auf eine spannungsabhängige Selektivität zurückzuführen sein. Möglicherweise nimmt die Blockade der Ionenbindungsstelle durch Magnesium- und Calciumionen bei positiven Spannungen ab.

Trotzdem wurden die wesentlichen Charakteristika der Strom/Spannungskurven reproduziert. Aus den Basiskonstanten (k^0) ließ sich das Energieprofil vom Kationen- und Protonentransport ermitteln, dass eine anschauliche Erklärung für den Ionentransport liefert (Abb. 4.1.3). Die Einwärtsgleichrichtung ergibt sich aus den unsymmetrischen Höhen der Energiebarrieren. Das abgebildete Energieprofil bildet die Transportraten unter Gleichgewichtsbedingungen ab, wenn die Summe aus ein- und ausströmenden Ladungsträgern null ist. Bei anliegenden elektrochemischen Gradienten ist das System nicht mehr im Gleichgewicht und es tritt ein Membranstrom auf. Durch die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Ionenkonzentration und Spannung ändern sich je nach den äußeren Bedingungen ihre Werte (vgl. Kap. 4.1.2). Aus dem Energieprofil ist ersichtlich, dass sowohl für Kationen als auch für Protonen im Gleichgewicht höhere Energiebarrieren beim Übergang vom Cytosol in die Außenlösung vorliegen als umgekehrt. Deshalb fließen bei einer Spannung von beispielsweise -100 mV und unter äquimolaren Bedingungen mehr Ladungsträger in die Zelle als bei +100 mV aus ihr heraus. Für Kationen liegt die höchste Energiebarriere beim Übergang vom Cytosol zur Bindungsstelle vor. Für Protonen liegt sie zwischen der Bindungsstelle und dem Außenmedium.

Des Weiteren reflektieren die Energieprofile die Affinität der Ionenbindungsstelle gegenüber den Ladungsträgern. Die Eintrittsbarrieren für Protonen sind sehr niedrig, deshalb wächst ihre Besetzungswahrscheinlichkeit mit zunehmender Konzentration stark an (Abb. 4.1.3-C). Die Energiebarrieren zum Verlassen der Bindungsstelle sind höher als die für Kationen. Als Konsequenz haben Protonen eine niedrigere Transportrate ($k^0_{-1H} = 2,6 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) und längere Verweildauer am Kanal. Die Eintrittsbarrieren für Kationen sind wesentlich höher und die Transportraten vom Außenmedium ($k^0_{-2M} = 7,4 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$) und Cytosol ($k^0_{1M} = 2,8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) zur Ionenbindungsstelle sind kleiner als die von Protonen ($k^0_{-2H} = 1,5 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$, $k^0_{1H} = 4,6 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$). Kationen haben aber eine kürzere Verweildauer an der Bindungsstelle und eine höhere Transportrate ins Cytosol ($k^0_{-1M} = 4,8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) als Protonen. Unter sauren Bedingungen steigt der Anteil von Protonen am Einstrom. Deshalb verschiebt sich das Umkehrpotential stetig in Richtung positiver Werte. Der Gesamteinstrom nimmt aufgrund der geringeren Permeabilität von Protonen aber nur wenig zu. Bei bestimmten pH_e-Werten kann er sogar abnehmen, wenn die Protonendichte am Kanal den Natriumstrom hemmt, der Protonengradient aber nicht ausreicht um dies zu kompensieren.

4.1.5 Modellierung der Kanalkinetiken

Für die Modellierung der Photoströme verwendete ich zunächst das 4-Zustandsmodell, das von Hegemann et al. für Channelrhodopsin-1 aufgestellt [28] und von Konstantin Nikolic an ChR2 angepasst wurde [29] (vgl. Abb. 1.7. B). Er konnte zeigen, dass nur durch das Modell mit zwei Offenzuständen (O_1 , O_2) und zwei geschlossenen Zuständen (C_1 , C_2) sowohl die Lichtabhängigkeit der Photoströme als auch deren biexponentielle *off*-Kinetik reproduziert werden kann. Eine zentrale Anforderung an das Modell war zudem, dass es die langsame *Recovery* Kinetik des transienten Stroms wiedergeben muss. Dies wird durch einen, im Vergleich zu den anderen Kinetiken, extrem langsamen Übergang von C_2 nach C_1 realisiert. Weitere Besonderheiten des Modells sind, dass unter physiologischen Bedingungen in O_1 20-mal mehr Ladungsträger transportiert werden als in O_2 . Außerdem ist nach Nicolice et al. die Aktivierungsrate von C_2 ebenfalls ca. 10-mal geringer als von C_1 [29]. Als Ursache kommt beispielsweise eine geringere Quantenausbeute von C_2 in Betracht. Ein weiteres Merkmal ist, dass die Kinetik $O_2 \rightarrow C_2$ deutlich langsamer als der analoge Übergang im ersten Zyklus ($O_1 \rightarrow C_1$) ist. Dieses Modell lässt sich durch das folgende Differentialgleichungssystem darstellen:

$$\begin{aligned}\frac{dC_1}{dt} &= -k_{11} \cdot C_1 + k_{13} \cdot O_1 + k_{24} \cdot C_2 \\ \frac{dO_1}{dt} &= -k_{12} \cdot O_1 - k_{13} \cdot O_1 + k_{11} \cdot C_1 + k_{22} \cdot O_2 \\ \frac{dC_2}{dt} &= -k_{21} \cdot C_2 - k_{24} \cdot C_2 + k_{23} \cdot O_2 \\ \frac{dO_2}{dt} &= -k_{22} \cdot O_2 - k_{23} \cdot O_2 + k_{21} \cdot C_2 + k_{12} \cdot O_1\end{aligned}$$

Die lichtabhängige Aktivierung von C_1 und C_2 wird durch die Geschwindigkeitskonstanten k_{11} und k_{21} dargestellt. Im Grundzustand befindet sich die gesamte Kanalpopulation in C_1 . Nach der Aktivierung stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein. Um den Strom bei -100 mV zu simulieren, habe ich die Konzentrationen von O_1 und O_2 jeweils mit den pauschalen Leitfähigkeiten g_1 und g_2 multipliziert. Ich bin dem Ansatz von Nicolice et al. gefolgt und ging davon aus, dass in O_1 20-mal mehr Ladungen transportiert werden als in O_2 . Daraus ergibt sich:

$$I_{O1} = -20 \cdot C_1 \text{ und } I_{O2} = -1 \cdot C_2$$

Damit war es möglich, das 4-Zustandsmodell nicht an experimentelle Photoströme anpassen zu müssen, deren Amplituden expressionsbedingt erheblich variieren können. Dagegen blieben die Kinetiken bei einer bestimmten experimentellen Bedingung unabhängig vom Expressionslevel immer gleich. Die simulierten

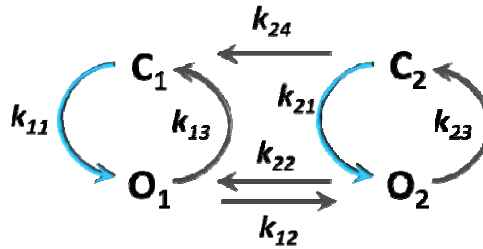


Abb. 4.1.4 4-Zustandsmodell von ChR2 zur Modellierung der Stromspuren. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in Abb. 1.7 B. Hier werden die für die Modellierung verwendeten Bezeichnungen für die Geschwindigkeitskonstanten eingeführt (blaue Pfeile: Lichtaktivierung, graue Pfeile: thermische Übergänge). (nach [28,29])

Photoströme sollen nur die gleichen kinetischen Eigenschaften wie die experimentellen haben. Deren absolute Größe spielt dabei keine Rolle, weil die Kinetik und das Verhältnis I_S/I_P beziehungsweise I_S/I_0 unabhängig von der Stromamplitude sind. Entscheidend für letzteres ist aber das Verhältnis von g_2 zu g_1 , das sich zwingend aus der Simulation der experimentellen Daten ergibt.

Diese Form der Berechnung entspricht, wie beim *Two Barrier* Modell, der Simulation eines einzelnen Kanals. Statt der Intermediatskonzentrationen wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, ein einzelnes Molekül in einem bestimmten Intermediat anzutreffen. Obwohl wir wissen, dass in O2 eine höhere Protonenselektivität vorliegt, können in beiden Zuständen Kationen und Protonen geleitet werden (vgl. Kap. 4.1.3). Die geringe Leitfähigkeit von O2 unter physiologischen Bedingungen könnte zum Teil auf die höhere Protonenselektivität zurückzuführen sein, wenn dadurch der Kationentransport inhibiert wird. Ebenso könnte aber auch eine veränderte Konformation in O2 einen reduzierten Ladungstransport verursachen.

Leider war es nicht möglich mit diesem Modell die ChR2 Photoströme unter Referenzbedingungen zufriedenstellend zu simulieren. Bei den Messungen bei pH_e 7,5/ -100 mV hatte die langsame Komponente der *off*-Kinetik ($\tau_2 = 77$ ms) einen Anteil von unter 10%. Die schnelle Komponente dominierte und hatte einen vergleichsweise kleinen τ -Wert (7,7 ms). Simulierte Photoströme mit diesen τ -Werten, zusammen mit einem I_S/I_P Verhältnis von unter 30% und einer Inaktivierung von ca. 50 ms resultieren aber in einem sehr großen Verhältnis von A_2/A_1 bei der *off*-Kinetik ($> 0,5$). Umgekehrt muss der Anteil von I_S sehr groß werden ($I_S/I_P > 0,5$), damit A_2/A_1 unter 0,2 sinkt (Abb. 4.1.5). In der Arbeit von Nikolic et al., wo dieses Modell zur Simulation verwendet wurde, wurde das Verhältnis A_2/A_1 der *off*-Kinetik nicht berücksichtigt [29].

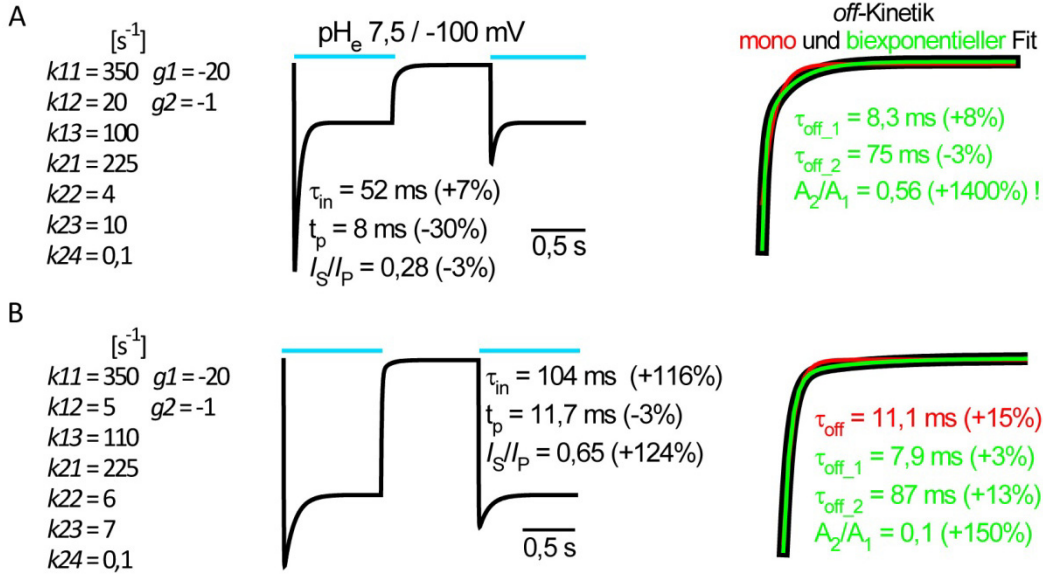


Abb. 4.1.5 Modellerte Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV. Links: Werte der Geschwindigkeitskonstanten im 4-Zustandsmodell (vgl. Abb. 4.1.4). **A** Mitte: Simuliertes Doppelpulsexperiment mit zwei Anregungspulsen (blaue Balken). Rechts: Vergrößerte off-Kinetik mit mono- (rot) und biexponentiellen (grün) Fits. Angegeben sind die jeweiligen kinetischen Parameter. Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off(1,2)}$: τ -Werte der off-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden von schneller und langsamer Komponente bei biexponentiellen Fits). Die kinetischen Eigenschaften entsprechen weitgehend den experimentellen Werten, aber der Anteil der langsamen Komponente (A_2) ist etwa 10-mal zu hoch. **B** Bei diesem 4-Zustandsmodell wird die Verringerung von A_2/A_1 nur durch die Anhebung von I_S/I_P und die Verlangsamung der Inaktivierung erreicht, was zu einem zu hohen Anteil des stationären Stroms (I_S) führt.

Um dieses Dilemma zu lösen, musste ein modifiziertes 4-Zustandsmodell verwendet werden (Abb. 4.1.6). Es basiert auf den photochromen Reaktionen des Anabaena *Sensory*-Rhodopsin Photozyklus [67] und wurde bereits als mögliche Alternative für ChR2 in Betracht gezogen [59]. Für das resultierende Differentialgleichungssystem gilt:

$$\frac{dC_1}{dt} = -k_{11} \cdot C_1 + k_{13} \cdot O_1 + k_{24} \cdot C_2 + k_{22} \cdot O_2$$

$$\frac{dO_1}{dt} = -k_{12} \cdot O_1 - k_{13} \cdot O_1 + k_{11} \cdot C_1$$

$$\frac{dC_2}{dt} = -k_{21} \cdot C_2 - k_{24} \cdot C_2 + k_{23} \cdot O_2 + k_{12} \cdot O_1$$

$$\frac{dO_2}{dt} = -k_{22} \cdot O_2 - k_{23} \cdot O_2 + k_{21} \cdot C_2$$

Hier stehen die beiden Offenzustände nicht in unmittelbarem Gleichgewicht zueinander. Vielmehr geht O1 weiterhin sehr schnell in den Grundzustand C1

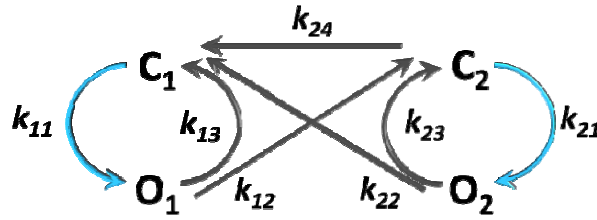


Abb. 4.1.6 Alternatives 4-Zustandsmodell zur Modellierung der Stromspuren von ChR2-WT und Mutanten. Im Gegensatz zum ersten 4-Zustandsmodell besteht hier kein direktes Gleichgewicht zwischen O1 und O2 (vgl. Abb. 1.7). (k : für die Modellierung verwendete Bezeichnungen der Geschwindigkeitskonstanten, blaue Pfeile: Lichtaktivierung, graue Pfeile: thermische Übergänge). (nach [59])

zurück, aber ein Teil der Moleküle relaxiert nach C2. Die Aktivierungsrate von C2 nach O2 ist in diesem Modell ebenfalls klein und wie im ersten 4-Zustandsmodell werden in O1 20-mal mehr Ladungsträger transportiert als in O2. Das Verhältnis A_2/A_1 und die τ -Werte der *off*-Kinetik sind hier direkt an die Stromamplituden und die Entvölkerung von O1 und O2 gekoppelt. Wegen des geringen Anteils von A_2 ergibt sich daraus zwangsläufig ein sehr kleiner Strom durch O2. Obwohl ein Großteil der Moleküle in diesem Zustand verweilt, wird der Großteil des stationären Stroms weiterhin von O1 getragen. Aus den Umkehrpotentialen des stationären Stroms wissen wir, dass O2 eine höhere Protonenselektivität als O1 besitzt. Das bedeutet, dass die Ionenbindungsstelle vermehrt durch Protonen besetzt wird. Da die Transportrate von Protonen aber geringer als die von Kationen ist, kann es sein, dass die Gesamtleitfähigkeit von O2 dadurch sehr schwach ist. Zudem könnten Konformationsänderungen ebenfalls zu einem reduzierten Ladungstransport führen, so dass selbst bei gleichem Verhältnis von Kationen- zu Protonenselektivität in O1 und O2 weniger Ladungen in O2 transportiert werden. Die rechnergestützte Anpassung dieses Modell an die experimentellen Daten funktionierte wesentlich besser (Abb. 4.1.7). Um die Berechnungsdauer zu minimieren, waren nur die Konstanten k_{12} , k_{22} und k_{23} frei. Die übrigen (k_{11} , k_{21} , k_{13} , k_{24}) habe ich im Vorfeld fixiert, nachdem in mehreren Testläufen die experimentellen Werte für das Intervall zum transienten Strom (t_p), der τ -Werte der *off*-Kinetik ($\tau_{\text{off},2}$) sowie der *Recovery* Kinetik (τ_{rec}) annähernd erreicht wurden. In der restlichen Diskussion beziehe ich mich, falls nicht explizit anders angegeben, immer auf das zweite 4-Zustandsmodell aus Abb. 4.1.6.

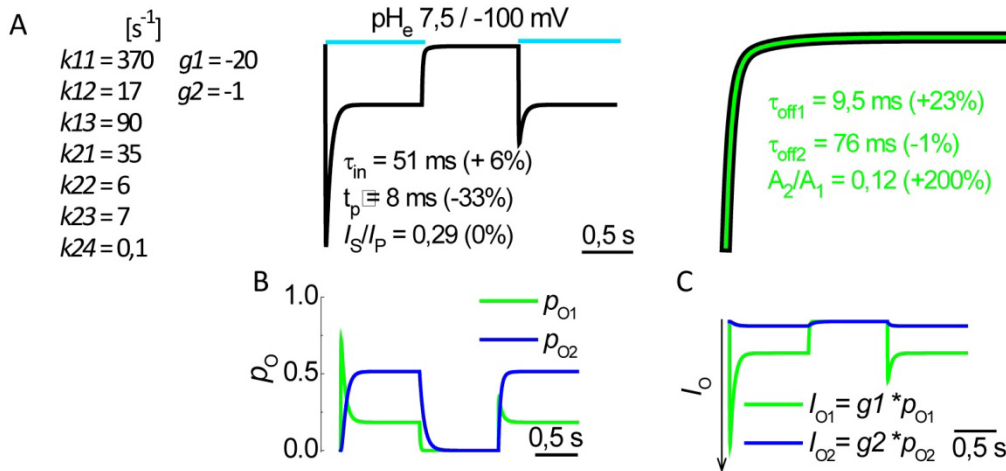


Abb. 4.1.7 Modellierung der ChR2 Stromspuren mit dem alternativen 4-Zustandsmodell bei pH_e 7,5/ -100 mV. **A** Links: Geschwindigkeitskonstanten (k) und Leitfähigkeiten (g) die im zweiten 4-Zustandsmodell verwendet wurden (vgl. Abb. 4.1.6). Mitte: Simuliertes Doppelpulsexperiment, mit zwei Anregungspulsen (blaue Balken). Rechts: Vergrößerte *off*-Kinetik mit biexponentiellem Fit (grün). Angegeben sind die jeweiligen kinetischen Parameter. Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. Mit diesem Modell können die experimentellen Beobachtungen wesentlich genauer wiedergegeben werden. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off1,2}$: τ -Werte der biphasischen *off*-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden von schneller und langsamer Komponente) **B** Besetzungswahrscheinlichkeit (p_O) und **(C)** Stromamplituden von O1 (grün) und O2 (blau) im Doppelpulsexperiment. Obwohl sich ein Großteil der Moleküle im Gleichgewicht in O2 befindet, wird ein Großteil des Stroms von O1 getragen.

4.1.6 pH_e - und Spannungsabhängigkeit der ChR2-WT Kinetiken

pH_e -Abhängigkeit

Die Photoströme von ChR2-WT zeigten bei -100 mV sehr unterschiedliche pH_e -Abhängigkeiten. So beobachtete ich eine kontinuierliche Beschleunigung der *Recovery* Kinetik unter zunehmend sauren Bedingungen. Dagegen waren die Kanalöffnung und Inaktivierung bei pH_e 9 und pH_e 4 am schnellsten. Unter Blitzlichtanregung war die Geschwindigkeit des Schließvorgangs bei -100 mV relativ unabhängig vom pH_e -Wert. Aber nach der Anregung mit Lichtpulsen trat insbesondere unter basischen Bedingungen eine zweite langsamere Komponente auf (Abb. 3.1.6). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass das Schließen des Kanals bei niedrigen cytosolischen pH-Werten langsamer wurde [1].

Nikolic et al. vermuteten, dass sich die Zustände des Kanals hinsichtlich der Protonierung bestimmter Aminosäuren unterscheiden [29]. Hier bieten sich wegen der hohen Anzahl geladener Reste praktisch unbegrenzte Möglichkeiten. So können die Übergänge zwischen den Zuständen von Protonierungsreaktionen begleitet sein, deren Geschwindigkeiten dann vom pH-Wert abhängen. Höchstwahrscheinlich haben die Intermediate auch unterschiedliche Konformationen. Deren Änderung könnte durch elektrostatische Interaktionen beeinflusst werden, die wieder vom Protonierungsgrad des Proteins abhängen. So kann die Geschwindigkeit einer Konformationsänderung von der Ladungsverteilung und damit indirekt vom pH_e -

Wert abhängen. Sein Einfluss kann dabei sehr komplex sein. ChR2 wird wie BR von einem Netzwerk geladener Reste durchzogen und besitzt eine hohe Anzahl basischer und saurer Reste auf der intra- und extrazellulären Oberfläche [14]. So könnte beispielsweise die Protonierung eines Aspartats auf der extrazellulären Seite den Ladungszustand auf der intrazellulären Seite durch weitreichende elektrische Wechselwirkungen ändern [68,69], wodurch z.B. die Öffnung oder das Schließen des Kanals beschleunigt werden könnte. Ein weiterer Faktor ist die Isomerisierung des Retinals. Vermutet wird, dass es nach der Anregung zur Isomerisierung des Retinals vermutlich von der *all-trans* in die *13-cis* Konfiguration kommt. Bisher konnte aber nicht geklärt werden, ob sich das Retinal im Offenzustand in *cis*- oder *trans*-Konfiguration befindet und ob dies den Unterschied zwischen einer geschlossenen oder offenen Pore ausmacht [22,26].

Da das 4-Zustandsmodell sehr einfach ist, fasst hier ein einzelner Übergang wahrscheinlich mehrere Schritte zusammen. Zum Beispiel wird durch die Lichtaktivierung des Grundzustands C1 die Isomerisierung des Retinals von *all-trans* zu *13-cis* geändert, die Schiffbase deprotoniert und wird wieder reprotoniert. Zudem muss der Kanal durch eine Konformationsänderung geöffnet werden (O1) [22]. Eine Änderung des pH_e -Wertes, sowie der Spannung könnte prinzipiell jeden dieser Prozesse beschleunigen oder verlangsamen. Mit dem Modell kann zwar der Einfluss des pH_e -Wertes auf die Geschwindigkeit bestimmter Übergänge gemacht werden, aber die molekularen Ursachen, die sich dahinter verbergen und die Unterschiede zwischen den Intermediaten sind schwierig vorherzusagen. Bedingt durch die Messmethode lassen sich nur allgemeine Aussagen über die Öffnung und das Schließen von ChR2, das Gleichgewicht O1/O2 sowie den langsamen Übergang von C2 nach C1 machen. Durch die Kanalkinetiken der Mutanten kann den substituierten Aminosäuren eine Funktion bei diesen Prozessen zugeordnet werden. Daher soll zunächst anhand der pH_e -Abhängigkeit der Wildtypkinetiken der Einfluss der Modellparameter auf die Photoströme erklärt werden.

Bei der Modellierung der pH_e -Abhängigkeit ließ ich das Verhältnis von g_2/g_1 beim Übergang zu sauren Bedingungen stetig ansteigen (Abb. 4.1.8). In O2 liegt offensichtlich eine höhere Protonenselektivität vor als in O1 (vgl. Kap. 4.1.3). Da Protonen den Transport von Kationen hemmen, war der I_0 Einstrom wegen der niedrigen Protonenkonzentration bei pH_e 9 sehr groß. Bei sinkenden extrazellulären pH-Werten nimmt aber auch bei O1 der Anteil geleiteter Protonen zu. Daher kann man argumentieren, dass durch die steigende Protonenkonzentration die Leitfähigkeit von O1 sinkt, weil Protonen den schnelleren Kationentransport hemmen. Dagegen ist die Protonenselektivität von O2 höher. Deshalb beeinträchtigen Protonen bei zunehmender Konzentration die Leitfähigkeit von O2 in geringerem Maße als die von O1. Stattdessen kann die Leitfähigkeit von O2 sogar zunehmen, da der zunehmende Protonenstrom keinen abnehmenden Kationenstrom kompensieren muss. Mit diesen Annahmen ist die Erhöhung von g_2/g_1 unter sauren Bedingungen berechtigt.

Die Kanalöffnung steht im direkten Zusammenhang mit der Geschwindigkeitskonstante k_{11} (C1 \rightarrow O1). Die Inaktivierung ist mit dem

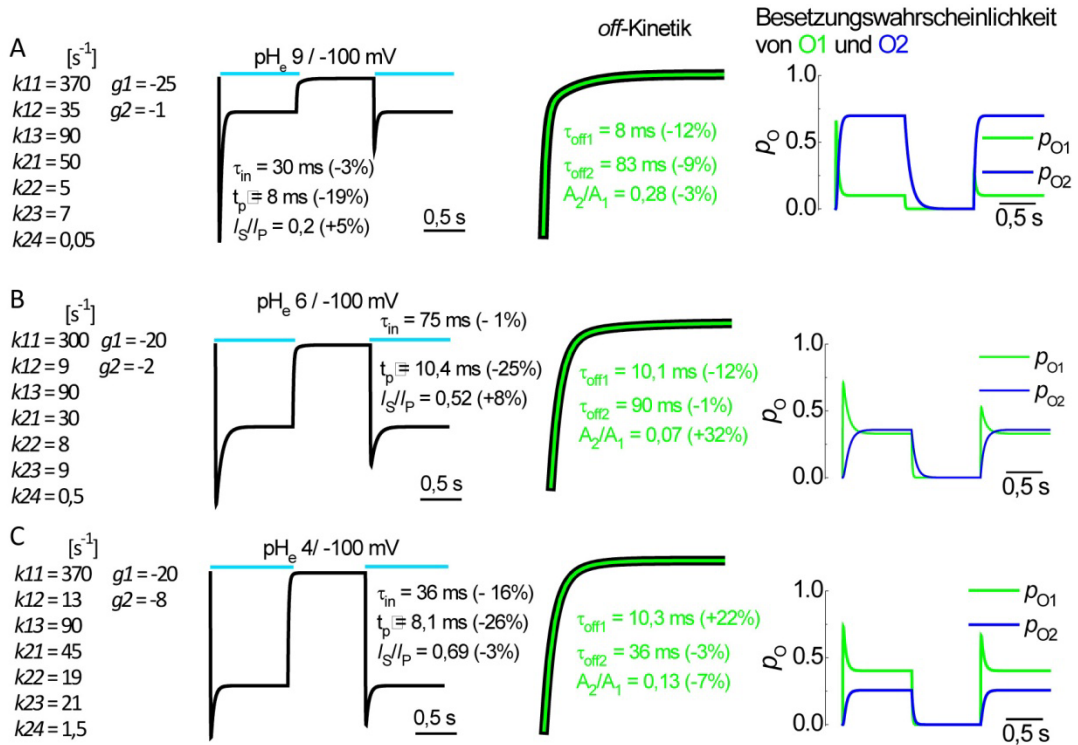


Abb. 4.1.8 Modellierung der ChR2 Stromspuren mit dem zweiten 4-Zustandsmodell unter basischen und sauren Bedingungen. **A** pH_e 9/ -100 mV **B** pH_e 6/ -100 mV **C** pH_e 4/ -100 mV. Links: Angabe der Geschwindigkeitskonstanten (k) und pauschalen Leitfähigkeiten (g), die für die Modellierung verwendet wurden. Mitte: Simulierte Stromspuren in Doppelpulsexperimenten und deren kinetische Parameter (vgl. Abb. 4.1.7). Daneben wurden die jeweiligen *off*-Kinetiken vergrößert dargestellt, die mit biexponentiellen Funktionen angepasst wurden (grün). Rechts: Besetzungswahrscheinlichkeiten von O1 und O2. Hier sieht man, dass der Anteil von O1 mit sinkendem pH_e -Wert steigt. Dies geht auf eine Verlangsamung von O1→C2 (k_{12}) zurück und insbesondere bei pH_e 4 auf eine Beschleunigung von O2→C1 (k_{22}).

Übergang zwischen O1 und C2, der durch k_{12} repräsentiert wird, verbunden. Zum Beispiel muss k_{12} klein sein, um die Inaktivierung zu beschleunigen. Bei den Lasermessungen an dunkeladaptierten Proben bildete die *off*-Kinetik zu fast 100% den Übergang O1 → C1 ($k_{13} = 90$ s⁻¹) ab, der wesentlich schneller verläuft als der Übergang in den zweiten Zyklus O1 → C2 ($k_{12} = 17$ s⁻¹). Daher wird O2 nach einer Laserblitzaktivierung nur wenig bevölkert und die *off*-Kinetik ist nahezu monoexponentiell. Unter kontinuierlicher Belichtung und insbesondere bei pH_e 9 war die *off*-Kinetik dagegen biexponentiell. Der Anteil und die Kinetik der zweiten, langsameren Komponente (A_2) ist direkt an die Strommenge, die durch O2 fließt und die Geschwindigkeitskonstanten k_{22} und k_{23} gekoppelt. Zum Beispiel war bei pH_e 7,5/ -100 mV das Verhältnis $A_2/A_1 < 0,1$. Daher muss der Beitrag von O2 am Gesamtstrom entsprechend klein sein. Dies wird durch eine geringe Leitfähigkeit von O2 ($g_2/g_1 = 0,05$) gewährleistet. Da die langsame Komponente der *off*-Kinetik unter Referenzbedingungen einen sehr großen τ -Wert hat, muss die Entvölkerung von C2 entsprechend langsam stattfinden. Das betrifft sowohl den Übergang O2 → C2 ($k_{23} = 7$ s⁻¹) als auch O2 → C1 ($k_{22} = 6$ s⁻¹). Obwohl die Population des Kanals in O2 größer ist als in O1, wird der Großteil des stationären Stroms von O1 getragen (Abb. 4.1.7). Dieser Anteil wird auch durch den Übergang O2 → C1

kontrolliert. Deren Geschwindigkeitskonstante k_{22} beeinflusst zusammen mit k_{12} die Geschwindigkeit der Inaktivierung.

Die Inaktivierung des Photostroms spiegelt den Übergang in den zweiten Zyklus des 4-Zustandsmodells wieder. Bei pH_e 9/ -100 mV stieg der Anteil der langsamen, protonenleitenden Komponente ($A_2/A_1 = 0,29$), obwohl die Protonenkonzentration abnahm. Gleichzeitig nahm die Geschwindigkeit der Inaktivierung zu und das Verhältnis I_S/I_P sank auf 0,19. Nach dem *Two Barrier* Modell ist die Hemmung des Ladungstransports durch Protonen bei pH_e 9 schwach, wodurch der Natriumeinstrom in der transienten Phase gegenüber niedrigeren pH_e -Werten relativ groß war. Um dem Rechnung zu tragen, habe ich das Verhältnis g_2/g_1 auf 0,04 gesetzt. Dadurch wurde zwar der stationäre Strom kleiner, aber auch der Anteil von O2 am Gesamtstrom reduziert. Deshalb muss bei pH_e 9 das Gleichgewicht deutlich in Richtung O2 verschoben werden (Abb. 4.1.8-A). Das wurde durch eine Beschleunigung des Übergang O1 \rightarrow C2 ($k_{12} = 35 \text{ s}^{-1}$) gegenüber pH_e 7,5 realisiert. Außerdem verlangsamte sich der Übergang O2 \rightarrow C1 ($k_{22} = 5 \text{ s}^{-1}$). Dadurch nimmt auch die Geschwindigkeit der Inaktivierung zu, was durch die experimentellen Beobachtungen bestätigt wurde.

Bei pH_e 6/ -100 mV lag der Anteil der langsamen Komponente der *off*-Kinetik bei 5%, während ihr τ -Wert hier sein Maximum erreichte (91 ms). Die Inaktivierung war auffällig langsam ($\tau_{in} = 76 \text{ ms}$) und der Anteil des stationären Strom stieg gegenüber I_P auf ca. 50%. Wegen der höheren extrazellulären Protonenkonzentration habe ich das Verhältnis von g_2/g_1 auf 0,1 gesetzt (Abb. 4.1.8-B). Die langsame Inaktivierung führte zu einem vergleichsweise kleinen Wert bei k_{12} (9 s^{-1}). Dies bedingte auch einen steigenden Anteil des stationären Stroms. Weil das Intervall zum transienten Strom (t_P) bei pH_e 6 am längsten war, wurden k_{11} und k_{21} reduziert.

Bei pH_e 4 beschleunigte sich die Inaktivierung wieder deutlich. Gleichzeitig war hier das Verhältnis von I_S zu I_P am größten ($\sim 0,7$). Die schnelle Komponente der *off*-Kinetik erfuhr eine deutliche Beschleunigung, wobei ihr Anteil auf 14% wuchs. Zunächst habe ich das Verhältnis g_2/g_1 auf 0,4 gesetzt (Abb. 4.1.8-C). Obwohl unter diesen extrem sauren Bedingungen bei O1 und O2 gleichermaßen eine hohe Protonendichte am Kanal vorliegen sollte, kann der für die Modellierung nötige, geringere Ladungstransport in O2 auf eine veränderte Konformation oder ungünstige elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu pH_e 9, wurde bei pH_e 4 die schnelle Inaktivierung nicht durch eine Beschleunigung des Übergangs von O1 \rightarrow C2 ($k_{12} = 13 \text{ s}^{-1}$) erreicht, weil dadurch der stationäre Strom zu klein werden würde. Stattdessen wurde der Übergang O2 \rightarrow C1 ($k_{22} = 19 \text{ s}^{-1}$) deutlich schneller, was auch den kleinen τ -Wert von A_2 bei der *off*-Kinetik erklärt ($\tau_2 = 36 \text{ ms}$). Die beschleunigte *Recovery* Kinetik, wurde wie bei den anderen pH_e -Werten über die Konstante k_{24} ($1,5 \text{ s}^{-1}$) reguliert. Generell lässt sich für ChR2-WT ableiten, dass dieser Übergang (C2 \rightarrow C1) mit zunehmender Protonenkonzentration im Außenmedium schneller wird. Das gilt auch für O2 \rightarrow C1 (k_{22}), wohingegen die Geschwindigkeit von O1 \rightarrow C2 (k_{12}) mit sinkendem pH_e -Wert tendenziell abnimmt. Aus den Laserblitzanregungen war bekannt, dass die *off*-

Kinetik dort relativ unabhängig vom pH_e -Wert ist. Daher habe ich k_{13} bei der Modellierung unverändert gelassen. Dagegen musste k_{23} bei pH_e 4 größer werden, um die experimentellen Kinetiken simulieren zu können. Allgemein beeinflusst der pH_e -Wert den Zerfall von O2 stärker als den von O1.

In den Strom/Spannungsmessungen war die pH_e -Abhängigkeit von I_0 und I_P schwächer als die von I_S . Dies kann nicht vollständig auf eine höhere Protonenselektivität von O2 zurückgeführt werden, da bei pH_e 4 der Großteil des stationären Stroms von O1 getragen wird. Die stärkere pH_e -Abhängigkeit von I_S liegt nach dem 4-Zustandsmodell vor allem an einer Zunahme der stationären O1 Population bei sinkenden pH_e -Werten. Der Unterschied bei den Umkehrpotentialen von I_0 und I_S konnte bei pH_e 9 nur gemessen werden, weil das Gleichgewicht hier sehr auf der Seite von O2 lag. Mit sinkendem pH_e -Wert nimmt nicht nur die Protonenpermeabilität in O1 zu, sondern auch der Anteil von O2 ab. Beide Faktoren verringern die Differenzen zwischen den Umkehrpotentialen von I_0 und I_S .

Spannungsabhängigkeit

Nach Laserblitzaktivierung konnte ich generell eine Verlangsamung des Schließvorgangs in Richtung positiver Membranpotentiale beobachten. Hier gab es aber erhebliche Unterschiede zwischen den pH_e -Werten. Bei -125 mV war die *off*-Kinetik bei pH_e 4 am langsamsten und es gab eine stetige Beschleunigung in Richtung pH_e 9. Bei +50 mV verlief das Schließen der Pore aber sowohl bei pH_e 9 als auch bei pH_e 4 schneller als bei pH_e 6 und pH_e 7,5 (Abb. 3.1.8-D). Die Spannungsabhängigkeit weist darauf hin, dass dieser Vorgang von einer oder mehreren Ladungsverschiebungen begleitet wird. Das könnte die Umlagerung eines Protons oder einer geladenen Aminosäure bei einer Konformationsänderung sein. Aufgrund der Spannungsabhängigkeit vermute ich, dass diese Ladungsverschiebung entgegengesetzt zum elektrischen Feld verläuft und den Schließvorgang bei positiven Potentialen hemmt. Bei pH_e 6 und pH_e 7,5 war die Spannungsabhängigkeit am deutlichsten. Auch bei pH_e 9 wurde die Kinetik zunächst langsamer, beschleunigte bei positiven Spannungen aber wieder. In BR beeinflussen sowohl der Protonengradient als auch das elektrische Feld dessen Protonierungsgrad [68,69] und die Ladungsverteilung. Bei pH_e 9/ +50 mV lag ein hoher, nach außen gerichteter elektrochemischer Gradient für Protonen vor. Möglicherweise führt dies bei ChR2 zu einem hohen Protonierungsgrad auf der cytosolischen Seite des Proteins, der das Schließen des Kanals beschleunigte.

4.2 Funktion von Aminosäuren im ChR2 Mechanismus

4.2.1 H134 als potentieller Transmitter des Protonenstroms

H134R

Die größere Stromamplitude von H134R konnte gegenüber früheren Studien bestätigt werden (Abb. 3.3.1) [49]. Ich vermute aber, dass dies hauptsächlich auf den hohen Anteil des stationären Stroms zurückgeht ($I_S/I_0 = 0,43$) (Abb. 3.3.4-F), der auch bei Lin et al. beobachtet wurde [50]. Die schwache pH_e Abhängigkeit der Stromamplituden weist darauf hin, dass bei H134R während der transienten Phase nur eine geringe Protonenpermeabilität vorliegt. Die Ionenselektivität hatte sich während der stationären Phase wahrscheinlich kaum verändert, da sich die Umkehrpotentiale von I_0 und I_S kaum unterschieden. Das könnte bedeuten, dass der leitende Zustand O2 eine ähnliche Ionenselektivität aufweist wie O1 oder dass der Anteil von O2 während der stationären Phase noch geringer ist als beim Wildtyp. Bei pH_e 9 lag das Verhältnis von A_2/A_1 bei der *off*-Kinetik bei 0,18 und damit unterhalb des Wertes von ChR2-WT (Abb. 3.3.4-E).

Die qualitativen Eigenschaften der I_0 -Kurven wurden von dem *Two Barrier* Modell relativ gut wiedergegeben (Abb. 4.2.1). Im Gegensatz zum Wildtyp findet die Überschneidung der simulierten *IV*-Kurven bei -120 mV statt. Die Abweichungen unter basischen und neutralen Bedingungen in NMG-Cl können, wie beim Wildtyp, mit nicht berücksichtigten Calciumionen erklärt werden. Des Weiteren war insbesondere bei pH_e 6/ -125 mV der Betrag der experimentellen Stromamplitude sehr viel kleiner als der simulierte Wert. In den *IV*-Kurven von I_0 und I_S war die

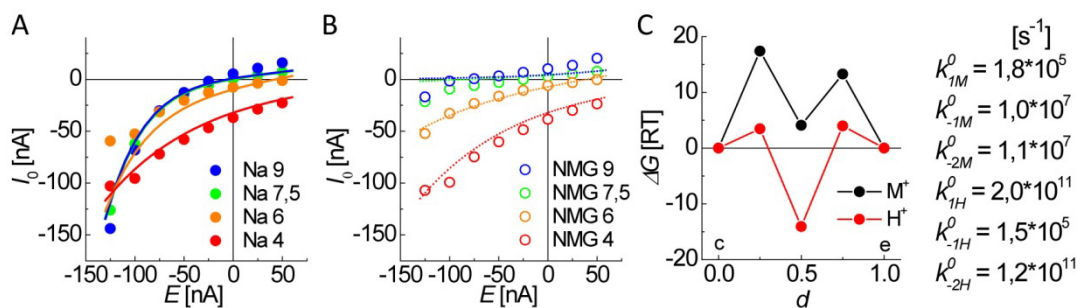


Abb. 4.2.1 Modellierung der *IV*-Kurven von H134R mit dem *Two Barrier* Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -27 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_S bei Na 7,5/ -100 mV). **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von H134R im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Die Eintrittsbarrieren für monovalente Kationen (M^+) sind höher als beim Wildtyp, da die entsprechenden Transportraten (k_{1M} , k_{2M}) kleiner sind. Der Protonentransport von der Bindungsstelle ins Cytosol (k_{1H}) und umgekehrt (k_{-1H}) ist gegenüber ChR2-WT ebenfalls etwas verringert. Der Transport gebundener Protonen ins Cytosol ist deutlich langsamer als der von M^+ ($k_{1H} < k_{1M}$). Dennoch führt die kleinere extrazelluläre Eintrittsbarriere für Protonen ($k_{2H} > k_{2M}$) zu einer zunehmenden Protonendichte an der Bindungsstelle bei sinkendem pH_e . Dadurch steigt der Anteil von Protonen am Einstrom, aber es kommt auch zur Verringerung des Einstroms von Ladungsträgern bei hohen negativen Spannungen.

Zunahme des Einstroms bei -125 mV unter sauren Bedingungen relativ schwach (Abb. 3.3.2). Die Amplituden fielen nicht wie erwartet weiter deutlich ab, sondern der Kanal schien durch die hohe Spannung inhibiert zu werden. Eine Sättigung des Kationenstroms kann jedoch ausgeschlossen werden, da der Einstrom bei pH_e 9/ -125 mV und 7,5/ -125 mV signifikant größer als bei pH_e 6 war. Daher lassen sich die Inhibierung bei pH_e 6 mV und pH_e 4 mV direkt auf die erhöhte Protonenkonzentration zurückführen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die hohe, negative Spannung in Kombination mit dem nach innen gerichteten Protonengradienten ein hoher Protonierungsgrad auf der extrazellulären Seite entsteht, der den Ladungstransport bei -125 mV plötzlich inhibiert.

Die Modellierung ergab eine stärkere Inhibition des Ladungstransports durch Protonen bei H134R im Vergleich zu ChR2-WT. Zum einen sind die Transportraten zur Bindungsstelle für Kationen langsamer und zum anderen nimmt der Protonentransport von der Bindungsstelle ins Cytosol ab ($k_{-IH}^0 = 1,5 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$). Die relativ großen Stromamplituden von H134R unter physiologischen Bedingungen (Na 7,5) gehen auf einen schnellen Transport von Kationen ins Cytosol zurück ($k_{-IM}^0 = 1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$). Bei neutralen pH_e Werten ist die Protonenkonzentration noch zu gering, um den Natriumeinstrom effizient zu blockieren.

Der pK-Wert von Histidin liegt in Proteinen etwa bei 7. Wechselnde Protonengradienten und Membranspannungen könnten den Protonierungszustand an Position 134 ändern, so dass je nach Bedingung eine positive oder keine Ladung vorliegt. Der pK-Wert von Arginin ist ca. 12,5. Daher lag bei H134R mit hoher Wahrscheinlichkeit eine positive Ladung unter allen experimentellen Bedingungen vor. Der Ionentransport scheint dadurch aber nicht grundlegend gestört zu werden, so dass im Wildtyp möglicherweise Histidin ebenfalls protoniert und positiv geladen vorliegt. Dies könnte durch eine in der Nähe befindliche negative Ladung, beispielsweise von einem Glutamat unterstützt werden. Die etwas geringere

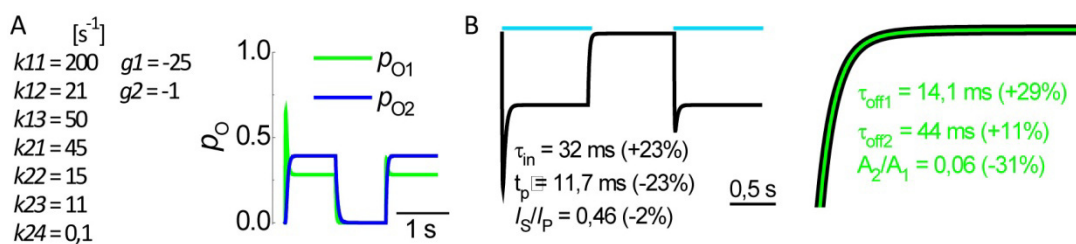


Abb. 4.2.2 Modellierung der H134R Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell. (vgl. Abb. 4.1.6) **A** Geschwindigkeitskonstanten (k) und Leitfähigkeiten (g) sowie die Besetzungswahrscheinlichkeiten (p_O) von O1 und O2 im Doppelpulsexperiment. Zur Simulation der Kinetiken musste die Leitfähigkeit von O1 (g_1) gegenüber O2 (g_2) erhöht werden. Die Übergänge O1→C2 (k_{12}) und O2→C1 (k_{22}) sind relativ schnell. Dadurch wird die Inaktivierung beschleunigt, aber der Anteil von O2 ist trotzdem kleiner als beim Wildtyp. **B** Simuliertes Doppelpulsexperiment mit zwei Anregungspulsen (blau). Rechts: Vergrößerte off-Kinetik mit biexponentiellem Fit (grün). Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off1,2}$: τ -Werte der biphasischen off-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden ihrer schnellen und langsamen Komponente)

Protonenpermeabilität von H134R könnte darauf zurückzuführen sein, dass Protonen über H134 in das Cytosol fließen und dieser Rest somit während des Photozyklus kurzzeitig protoniert wird. Da der pK-Wert von Arginin größer als der von Histidin ist, könnte die Deprotonierung an Position 134 energetisch ungünstiger sein und damit der Einstrom von Protonen reduziert werden.

Bei der H134R Kinetik fiel auf, dass sowohl die Inaktivierung (τ_{in}) als auch die langsame Komponente der *off*-Kinetik (τ_2) schneller als beim Wildtyp waren. Die Simulation der H134R Kinetiken unter Referenzbedingungen erfolgte mit dem 4-Zustandsmodell und ergab gegenüber dem Wildtyp eine Beschleunigung der Übergänge $O1 \rightarrow C2$ ($k_{12} = 21 \text{ s}^{-1}$), $O2 \rightarrow C1$ ($k_{22} = 15 \text{ s}^{-1}$) sowie $O2 \rightarrow C2$ ($k_{23} = 11 \text{ s}^{-1}$) (Abb. 4.2.12). Dagegen wurden die Übergänge vom Grundzustand in den ersten Offenzustand ($k_{11} = 200 \text{ s}^{-1}$) und die Entvölkerung von O1 ($k_{13} = 50$) langsamer. Das bedeutet, dass die Mutation die Übergänge zwischen den beiden Zyklen beschleunigt, während die Aktivierung und Deaktivierung von O1 langsamer werden. Im Gleichgewicht wird der Anteil von O1 dadurch größer als beim Wildtyp.

Die Änderungen der Kanalkinetiken könnten durch veränderte elektrostatische oder sterische Wechselwirkungen verursacht werden. Ob dabei Wechselwirkungen mit der Schiffbase eine Rolle spielen, kann momentan nicht ausgeschlossen werden. Erste Messungen mit Blitzlichtphotolyse im UV/Vis-Bereich, von Katja Stehfest und Stefanie Kathe (unpubliziert) lassen jedoch darauf schließen, dass die Schiffbase weiterhin relativ ungehindert reprotoniert wird. Entweder wird diese Reaktion, wie beim BR, durch diese Position vermittelt und durch R134 nicht gestört oder die Reprotonierung hängt in ChR2 nicht von dieser Position ab.

H134D

Im Gegensatz zu H134R, zeigten die H134D *IV*-Kurven deutliche Abweichungen zum Wildtyp. So gab es in NaCl in der Anfangsphase eine eindeutige Abnahme des Einstroms von Kationen bei zunehmender Protonenkonzentration außen (Abb. 3.3.5). Trotzdem verschob sich das Umkehrpotential bei sinkenden pH_e -Werten deutlich in Richtung positiver Werte und der Anteil von Protonen am Gesamtstrom nahm stetig zu. Dies sind Anzeichen dafür, dass Protonen mit einer hohen Selektivität binden, diese aber eine sehr geringe Transportrate haben und den Einstrom positiver Ladungsträger wesentlich stärker hemmen als dies beim Wildtyp der Fall ist.

Mit dem *Two Barrier* Modell, konnten die qualitativen Eigenschaften der *IV*-Kurven reproduziert werden (Abb. 4.2.3). Auch wenn sie bei pH_e 9 und pH_e 7,5 wieder dicht beieinander lagen, nahmen die Einstrome in Richtungen hoher extrazellulärer Protonenkonzentrationen eindeutig ab. Des Weiteren verschob sich das Umkehrpotential in Richtung positiver Werte und der Anteil von Protonen am Gesamtstrom nahm zu. Das Energieprofil unter Gleichgewichtsbedingungen zeigt sehr hohe Eintrittsbarrieren für Kationen ($k_{-2M}^0 = 1,1 \cdot 10^7$), die sich aus den kleinen Stromamplituden ergeben. Nach dem Modell ist deren Transport in das Cytosol sogar schneller als beim Wildtyp ($k_{-1M}^0 = 7,4 \cdot 10^6$). Da die Eintrittsbarrieren für

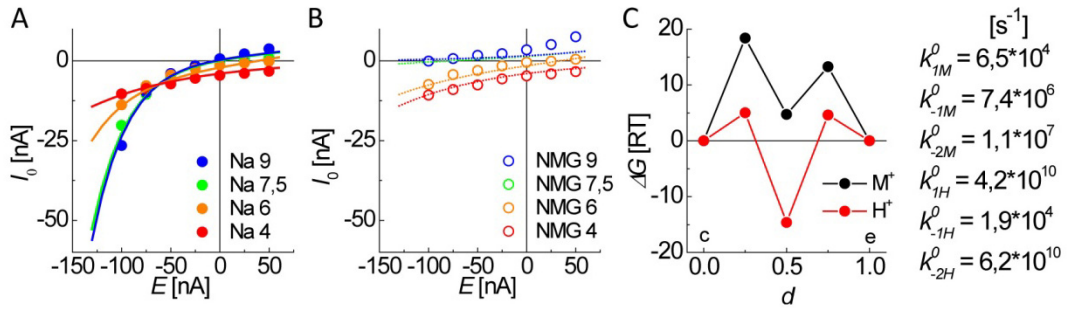


Abb. 4.2.3 Modellierung der IV-Kurven von H134D mit dem Two Barrier Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -8 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_s bei Na 7,5/ -100 mV). **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von H134D im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Wegen der kleinen Photoströme von H134D sind zwangsläufig fast sämtliche Transportraten vergleichsweise langsam. Besonders stark betroffen ist der Protonentransport von der Bindungsstelle ins Cytosol (k_{1H}) und Außenmedium. Daher sind die entsprechenden Energiebarrieren höher als beim Wildtyp. Die Bindung von Protonen (H^+) wird dadurch sehr stark. Der Transport monovalenter Kationen (M^+) von der Bindungsstelle ins Cytosol verläuft deutlich schneller als der von H^+ ($k_{-1M} > k_{-1H}$). Da die Transportrate von M^+ vom Außenmedium zur Bindungsstelle jedoch viel kleiner ist ($k_{-2M} < k_{-2H}$), wird der Kanal bei sinkendem pH_e zunehmend von H^+ besetzt und der Gesamteinstrom nimmt ab.

Protonen jedoch kleiner sind als für Kationen, besetzen sie zunehmend den Kanal wenn der pH-Wert im Außenmedium sinkt. Das Modell zeigt eine relativ hohe Energiebarriere für den Protonentransport von der Bindungsstelle in das Cytosol. Der Weitertransport von Protonen in das Cytosol ist entsprechend langsam ($k_{-1H}^0 = 1,9 \cdot 10^4$) und der Einstrom von Ladungsträgern nimmt ab.

In H134D befindet sich an der Position ein Aspartat, an der auch bei BR dieser Rest zu finden ist. Bei BR ist D96 im Grundzustand protoniert und ungeladen. Im Laufe des BR-Photozyklus wird dieser Rest deprotoniert und fungiert als Protonendonator für die SB [70]. Möglicherweise hat ChR2-D134 durch elektrostatische Wechselwirkungen mit negativen Ladungen in der Nähe einen relativ hohen pK-Wert und ist dadurch dauerhaft protoniert. In diesem Fall wäre ein potentieller Protonentransport über Position 134 erschwert, was die niedrige Transportrate für Protonen erklären würde.

Die Kinetik von H134D unter neutralen Bedingungen weist einige Besonderheiten auf. Nach dem Ende einer Belichtung fiel der stationäre Strom extrem langsam ab (Abb. 3.3.6-B). Die *off*-Kinetik war wieder biexponentiell, wobei die τ -Werte beider Komponenten größer im Vergleich mit den Wildtypwerten waren (Abb. 3.3.7-C). Da bei dieser Mutante keine Anregung mit Laserblitzen durchgeführt werden konnte, kann experimentell nicht belegt werden, ob die langsamere Komponente die Entvölkerung von O1 oder O2 im 4-Zustandsmodell repräsentiert. Offensichtlich haben beide Offenzustände deutlich verlängerte Lebenszeiten. Trotzdem bleibt der Gesamtstrom des Kanals klein, woraus folgt, dass dies tatsächlich ein Transportphänomen ist und keine kinetischen Ursachen hat. Das Verhältnis von $A_2/A_1 = 1,1$ spricht für einen hohen Beitrag von O2 am

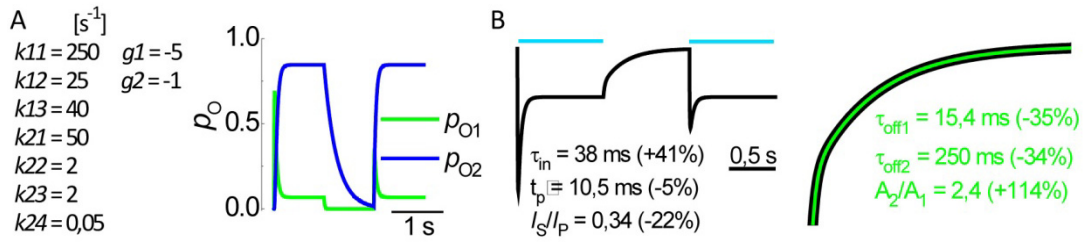


Abb. 4.2.4 Modellierung der H134D Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell. (vgl. Abb. 4.1.6) **A** Geschwindigkeitskonstanten (k) und Leitfähigkeiten (g) sowie die Besetzungswahrscheinlichkeiten (p_O) von O1 und O2 im Doppelpulsexperiment. Wegen des hohen Anteils der langsamen Komponente bei der off-Kinetik muss ein Großteil der Moleküle in den zweiten Zyklus übergehen. Dies wird durch einen schnellen Übergang O1→C2 (k_{12}) und einen langsamen Übergang O2→C1 (k_{22}) realisiert. O2 akkumuliert auch wegen des langsamen Übergangs nach C2 (k_{23}). Dadurch wird die off-Kinetik sehr langsam. Wegen der relativ großen stationären Ströme musste die Leitfähigkeit von O2 (g_2) gegenüber O1 (g_1) erhöht werden. **B** Simuliertes Doppelpulsexperiment mit zwei Anregungspulsen (blau). Rechts: Vergrößerte off-Kinetik mit biexponentiellem Fit (grün). Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. Im Vergleich zum experimentellen Wert ist der Anteil der langsamen Komponente (A_2) der off-Kinetik mehr als doppelt so groß. Die Verringerung von A_2/A_1 würde jedoch zur weiteren Abnahme von I_S/I_P führen. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off1,2}$: τ -Werte der biphasischen off-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden ihrer schnellen und langsamen Komponente)

Gesamtstrom. Das könnte zum Beispiel dadurch erreicht werden, dass der Anteil der Kanäle, die sich in O2 befinden, während der stationären Phase sehr groß ist und der Anteil der Kanäle in O1 sehr klein. Je nachdem ob ein kleiner Wert von k_{13} oder k_{23} den langsamen Abfall des stationären Stroms bedingt, müssen auch k_{12} oder k_{22} kleiner werden, da sonst O1 oder O2 durch die Übergänge in den jeweils anderen Zyklus des 4-Zustandsmodells entvölkert werden. Die schnelle Inaktivierung ist ein Hinweis darauf, dass der Übergang O1→C2 (k_{12}) schnell verläuft. Zudem würde ein schneller Übergang von O2 nach C1 (k_{22}) zu einer Abnahme des Verhältnisses A_2/A_1 führen. Daher gehe ich davon aus, dass die langsame Komponente der off-Kinetik durch kleine Werte bei k_{23} und k_{22} bedingt wird. Dadurch befindet sich in der stationären Phase ein Großteil der Moleküle in O2 (~85%) (Abb. 4.2.4-A). Das ursprünglichen Verhältnis $g_2/g_1 = 0,05$ ist aber zu klein um den hohen Anteil der langsamen Komponente am Gesamtstrom zu erklären. Daher habe ich ihn Laufe der Modellierung heraufgesetzt ($g_2/g_1 = 0,2$). Als molekulare Ursache kommt dafür eine starke Reduktion der Leitfähigkeit von O1 in Frage. Dadurch nimmt gleichzeitig das Verhältnis I_S/I_P zu.

Allerdings sind die Abweichungen zu den experimentellen Daten relativ groß und deshalb ist es fraglich, ob das 4-Zustandsmodell in dieser einfachen Form auf H134D angewandt werden kann. Es steht aber fest, dass die Entvölkering von O2 stark verlangsamt ist. Höchstwahrscheinlich muss das 4-Zustandsmodell um zusätzliche Intermediate erweitert werden, um die Photoströme von H134D simulieren zu können.

Die Auswirkungen der Mutation auf die Kinetik waren so erheblich, dass die gängigen Zustandsmodelle nicht für die vollständige Modellierung ausreichten. Die on-Kinetik und die Inaktivierung glichen aber weitgehend den Wildtypwerten. Da

aus UV/Vis-Messungen mit Blitzlichtphotolyse bekannt ist, dass die Reprotonierung der Schiffbase vor der Kanalöffnung stattfindet, ist es fraglich ob dieser Prozess durch die Mutation beeinflusst wurde. Die stärksten Auswirkungen sah man beim Schließen des Kanals. Möglicherweise deprotoniert D134 im Laufe des Photozyklus, wobei eine negative Ladung das Schließen des Kanals verlangsamen könnte. Bei H134R, liegt an gleicher Position vermutlich dauerhaft eine positive Ladung vor und auch im Wildtyp besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit das H134 während des Photozyklus positiv geladen ist. Eine negative Ladung an dieser Stelle könnte die elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb des Kanals erheblich verändern.

H134N

H134N zeichnete sich durch signifikant vergrößerte Stromamplituden unter Referenzbedingungen aus (Abb. 3.3.1). Allerdings war dies begleitet von einer sehr schwachen pH-Abhängigkeit sowohl des Anfangsstroms (I_0) als auch des stationären Stroms (I_s) (Abb. 3.3.8). Die Strom/Spannungskurven konnten sehr gut durch das *Two Barrier* Modell simuliert werden (Abb. 4.2.5). Danach kommt es bei H134N, gegenüber dem Wildtyp, zu einer Verlangsamung des Transports von Kationen vom Außenmedium zur Bindungsstelle ($k_{-2M}^0 = 3,1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$). Dagegen verläuft deren Weitertransport in das Cytosol schneller ($k_{-1M}^0 = 1,8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$). Dadurch war der Einstrom von Ladungsträgern unter basischen und neutralen Bedingungen hoch. Bei sinkenden pH_e -Werten wurde der Kanal jedoch zunehmend von Protonen besetzt, da deren Eintrittsbarrieren wesentlich niedriger sind als die für Kationen. Nach dem Modell verläuft bei H134N der Transport von Protonen in

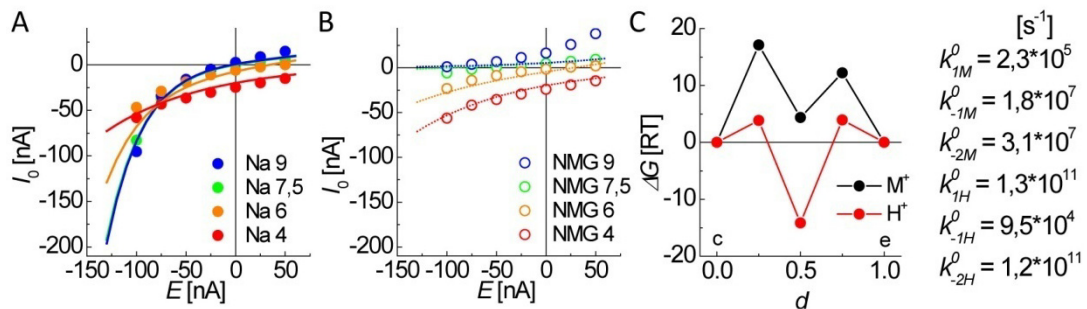


Abb. 4.2.5 Modellierung der IV-Kurven von H134N mit dem *Two Barrier* Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -43 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_s bei Na 7,5/ -100 mV). **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von H134N im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Bei H134N ist die Bindung monovalenter Kationen (M^+) schwächer als beim Wildtyp. Die Transportrate vom Außenmedium zur Bindungsstelle ist relativ klein (k_{-2M}). Außerdem ist der Protonentransport von der Bindungsstelle ins Cytosol gegenüber ChR2-WT deutlich verringert (k_{-1H}). Die Bindung von Protonen (H^+) wird dadurch stärker. Obwohl die Transportrate von M^+ von der Bindungsstelle ins Cytosol relativ groß ist (k_{-1M}), wird der Kanal wegen der niedrigeren extrazellulären Eintrittsbarriere für H^+ ($k_{-2H} > k_{-2M}$) bei sinkendem pH_e zunehmend von Protonen besetzt. Deren Anteil am Gesamteinstrom steigt. Wegen der kleineren Transportrate von Protonen von der Bindungsstelle ins Cytosol ($k_{-1H} < k_{-1M}$) nimmt er jedoch ab.

das Cytosol langsamer ($k_{-IH}^0 = 9,5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$) als beim Wildtyp. Da sie die Kationen von der Bindungsstelle verdrängen, nimmt der Gesamteinstrom von Ladungsträgern in sauren Medien ab.

H134N hatte unter neutralen Bedingungen eine etwas verzögerte *on*- und deutlich langsamere *off*-Kinetik im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.3.11-D) aber eine ähnlich schnelle Inaktivierung (Abb. 3.3.10-B). Der Anteil der langsamen Komponente (A_2) bei der *off*-Kinetik nach Anregung mit Lichtpulsen war etwas höher (Abb. 3.3.10-H). Die Abweichungen waren aber insgesamt nicht so stark wie bei H134D. Die Modellierung der Photoströme mit dem 4-Zustandsmodell ergab, dass vor allem die Übergänge $O1 \rightarrow C1$ ($k_{13} = 40 \text{ s}^{-1}$) und $O2 \rightarrow C2$ ($k_{23} = 3 \text{ s}^{-1}$) verzögert abliefen. Dadurch ist die Population der Moleküle, die sich im Gleichgewicht in einem leitenden Zustand befinden etwas höher als beim Wildtyp.

Durch die Einführung von Asparagin befindet sich eine ungeladene und nicht protonierbare Seitengruppe an Position 134. Unter der Annahme, dass Protonen über H134 in das Cytosol fließen, könnte dies zu einer Inhibierung des Protonentransports führen. Während die Kanalöffnung und die Inaktivierung durch diese Mutation kaum beeinträchtigt waren, kam es insbesondere beim Schließen zu Verzögerungen. Möglicherweise wurde dies durch das Fehlen einer positiven Ladung an Position 134 verursacht. Weitere Ursachen könnten sterische Wechselwirkungen oder eine veränderte Struktur des umgebenden Wasserstoffbrückennetzwerks sein.

In BR führte diese Mutation (D96N) zur einer dramatischen Reduzierung der Pumpaktivität (2-3%) und zu einem 100 bis 500-fachen Verlangsamung des Photozyklus, da die SB nicht durch D96, sondern aus dem Cytoplasma reprotoniert wird [70]. Es kam zwar auch in H134N zu einer leichten Verzögerung bei der Kanalöffnung, der die Reprotonierung der SB vorangeht, aber es gab keine mit BR-D96N vergleichbaren Beeinträchtigungen der Kinetik und der Aktivität des Kanals. Eine mögliche Funktion von H134 bei der Reprotonierung der SB bleibt damit weiter fraglich.

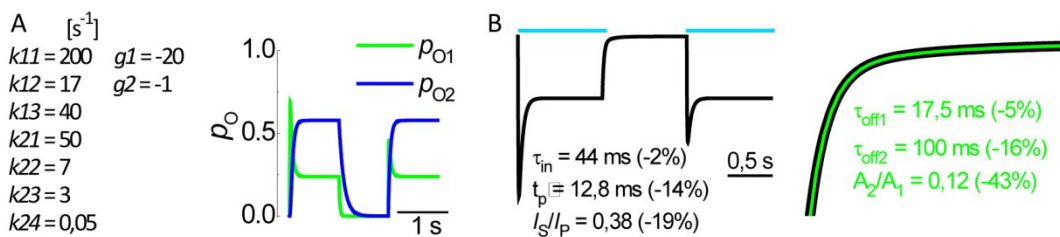


Abb. 4.2.6 Modellierung der H134N Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell. (vgl. Abb. 4.1.6) **A** Geschwindigkeitskonstanten (k) und Leitfähigkeiten (g) sowie die Besetzungswahrscheinlichkeiten (p_o) von O1 und O2 im Doppelpulsexperiment. Der langsame Zerfall von O1 (k_{13}) und O2 (k_{23}) führen zu einer etwas höheren Akkumulation von O2 gegen über dem Wildtyp. Daraus resultieren langsamere *off*-Kinetiken, ein höherer Anteil des stationären Stroms, sowie ein höherer Anteil der langsamen Komponente bei der *off*-Kinetik. **B** Simuliertes Doppelpulsexperiment mit zwei Anregungspulsen (blau). Rechts: Vergrößerte *off*-Kinetik mit biexponentiellem Fit (grün). Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off1,2}$: τ -Werte der biphasischen *off*-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden ihrer schnellen und langsamen Komponente)

H134S

H134S weist wieder die typischen Eigenschaften dieser Gruppe von Mutanten auf. So waren die Einstrome sowohl in der Anfangs- als auch in der stationären Phase nur schwach pH_e -abhängig (Abb. 3.3.12) und in NaCl kam es zwischen pH_e 9 und pH_e 6 zur Abnahme des Einstroms. Allerdings waren die Stromamplituden bei dieser Chr2 Variante vergleichsweise klein (Abb. 3.3.1).

Nach dem *Two Barrier* Modell ist der Kationentransport vom Außenmedium zur Ionenbindungsstelle ($k_{-2M}^0 = 1,3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$) gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert. Dadurch waren die Stromamplituden bei pH_e 7,5 klein, obwohl der Transport in das Cytosol schneller verläuft als beim Wildtyp ($k_{-1M}^0 = 1,1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$). Zudem sind die Eintrittsbarrieren für Protonen klein und deren Verweildauer an der Bindungsstelle lang, da ihr Weitertransport in das Cytosol inhibiert ist ($k_{-1H}^0 = 6,1 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$), was eine erhebliche Reduzierung der Protonenpermeabilität bedeutet. Durch die hohe Protonenaffinität der Bindungsstelle ist die inhibitorische Wirkung von Protonen entsprechend größer. Dadurch nimmt der Einstrom von Ladungsträgern bei sinkenden pH_e -Werten ab.

Um die Kinetiken von H134S unter neutralen Bedingungen mit dem 4-Zustandsmodell simulieren zu können, musste ich davon ausgehen, dass es zu einer Reduktion der Leitfähigkeit in O1 kam. Das Verhältnis g_2/g_1 wurde daher auf 0,1 gesetzt. Wie bei H134D konnten die H134S Photoströme aber nicht zufriedenstellend simuliert werden (Abb. 4.2.8). Die Inaktivierung ist sehr schnell, was für einen hohen Anteil von O2 spricht. Das lässt sich aber nicht mit dem relativ hohen Anteil des stationären Stroms vereinbaren ($I_s/I_p = 0,62$). Eine weitere Absenkung der Leitfähigkeit von O1 führt wiederum zu einem zu hohen Verhältnis A_2/A_1 bei der *off*-Kinetik. Ein schnellerer Übergang $O2 \rightarrow C2$ beschleunigt dagegen die langsame Komponente der *off*-Kinetik zu stark. Eine Möglichkeit den

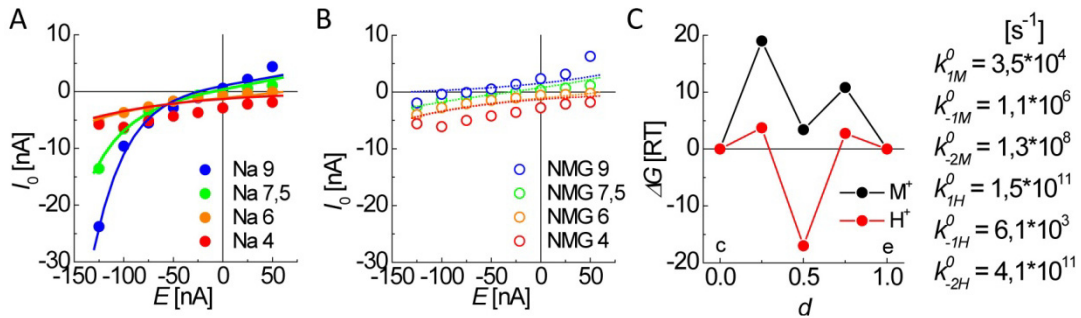


Abb. 4.2.7 Modellierung der IV-Kurven von H134S mit dem *Two Barrier* Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -3,8 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_s bei Na 7,5/ -100 mV). **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von H134S im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Die kleinen Photoströme von H134S bedingen teilweise sehr kleine Transportraten für monovalente Kationen (M^+) und Protonen (H^+). Die Bindungswahrscheinlichkeit von Protonen ist wegen der relativ kleinen Eintrittsbarrieren und den sehr langsamen Transport von der Bindungsstelle jedoch sehr hoch. Da die extrazelluläre Eintrittsbarriere für H^+ kleiner ist als die für M^+ ($k_{-2H} > k_{-2M}$), werden bei sinkenden pH_e mehr Protonen gebunden und deren Anteil am Einstrom steigt. Da die Protonentransportrate von der Bindungsstelle ins Cytosol jedoch kleiner ist als die von M^+ ($k_{-1H} < k_{-1M}$) nimmt der Gesamteinstrom ab.

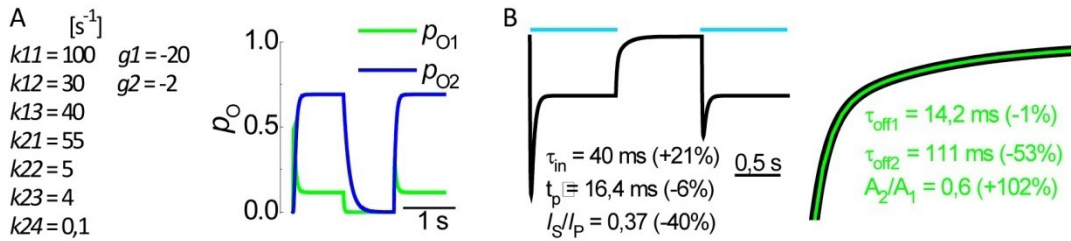


Abb. 4.2.8 Modellierung der H134S Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell. (vgl. Abb. 4.1.6) **A** Geschwindigkeitskonstanten (k) und Leitfähigkeiten (g) sowie die Besetzungswahrscheinlichkeiten (p_o) von O1 und O2 im Doppelpulsexperiment. Der schnelle Übergang O1→C2 (k_{12}) und der langsame Übergang O2→C1 bewirken eine Akkumulation von O2, was durch den langsamen Zerfall von O2 (k_{23}) verstärkt wird. **B** Simuliertes Doppelpulsexperiment mit zwei Anregungspulsen (blaue Balken). Rechts: Vergrößerte *off*-Kinetik mit biexponentiellem Fit (grün). Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. Im Vergleich zum experimentellen Wert ist der Anteil der langsamen Komponente (A_2) mehr als doppelt so groß und der Anteil des stationären Stroms zu niedrig. Die Verringerung von A_2/A_1 würde jedoch zur weiteren Abnahme von I_S/I_P führen. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off1,2}$: τ -Werte der biphasischen *off*-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden von schneller und langsamer Komponente)

transienten Strom zu reduzieren, war die starke Absenkung der Aktivierung ($k_{11} = 100 \text{ s}^{-1}$). Wie bei H134D reicht aber das 4-Zustandsmodell nicht aus, um die Photoströme von H134S zu reproduzieren.

Serin ist wie Asparagin eine polare und ungeladene Aminosäure. Die Kinetiken von H134S und H134N wiesen einige Ähnlichkeiten auf. Zum Beispiel verliefen die Übergänge zum stationären Strom schnell, während die *off*-Kinetiken langsam waren. Daher können bei diesen Vorgängen die elektrostatischen Wechselwirkungen von Position 134 eine Rolle spielen.

H134F

In Sensory Rhodopsin II befindet sich an der Position, an der in BR D96 lokalisiert ist, ein Phenylalanin (F86). Der Photozyklus von SR II ist etwa 100-mal langsamer als der von BR, was einer verzögerten Reprotonierung der Schiffbase zugeschrieben wird. Dafür ist nicht allein das Phenylalanin verantwortlich, aber die Mutation SR II-F86D führte zu einer signifikanten Beschleunigung der Reprotonierung [51]. Die Reprotonierung der Schiffbase in ChR2 verläuft im Vergleich zu BR etwa 10-mal schneller ab [22]. Die Einführung von F134 führte zu keiner sichtbaren Verzögerung bei der Kanalöffnung (Abb. 3.3.15-C), die mit der Reprotonierung der Schiffbase korreliert zu sein scheint. Deshalb ist H134 entweder nicht an der Reprotonierung beteiligt oder die Reprotonierung der Schiffbase läuft in H134F verzögert ab, induziert aber nicht die Kanalöffnung. Darüber müssen letztendlich spektroskopische Messungen Aufschluss geben.

Für die Modellierung mit dem *Two Barrier* Modell wurden zwar nicht genügend Daten aufgenommen, aber die *IV*-Kurven lassen ebenfalls auf eine reduzierte Protonenpermeabilität schließen, da es wie bei den anderen H134 Mutanten in NaCl zur Abnahme des Einstroms zwischen pH_e 9 und pH_e 6 kam.

Die aromatische Seitengruppe von Phenylalanin ist etwas größer als die von Histidin. Sie ist zudem neutral und nicht in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Dies kann zwar zur Reduktion des Protoneneinstroms beitragen, aber scheint sich strukturell nicht negativ auszuwirken, da die Kanalkinetiken relativ stabil blieben.

Fazit H134

Nach dem *Two Barrier* Modell verzeichneten alle H134 Mutanten eine Reduktion der Protonenpermeabilität, ausgelöst durch eine hohe Energiebarriere zwischen der Ionenbindungsstelle und dem Cytosol. Zudem war die Affinität der Mutanten gegenüber Kationen relativ klein. Aus dem Homologiemodell von ChR2 wissen wir, dass sich H134 auf der cytosolischen Seite des Kanals befindet (Abb. 1.8). Zudem ist dieser Rest in allen bekannten Channelrhodopsinen konserviert. Das kann bedeuten, dass H134 eine zentrale Rolle bei der Ionentranslokation spielt. Möglicherweise befindet es sich in der Nähe der Kanalpore oder ist sogar ein Teil von ihr. Dann könnte die fehlende Protonierbarkeit der eingeführten Reste für die Reduktion des Protonentransports verantwortlich sein. Eine molekulare Erklärung für die niedrige Kationenselektivität bleibt zwar noch offen, aber sie könnte auf veränderte elektrostatische Wechselwirkungen der Bindungsstelle mit den Kationen zurückgehen.

Mutationen an BR-D96 hatten erheblichen Einfluss auf die Kinetik und die Protonentranslokation von BR. Die Ursache hierfür findet sich in der inhibierten Reprotonierung der Schiffbase. Es gibt spektroskopische Belege dafür, dass die Reprotonierung in ChR2 vor oder mit der Kanalöffnung stattfindet [22]. Potentiell könnte H134 diese Aufgabe übernehmen, so führten die Mutationen teilweise zu einer Verlangsamung der Kanalöffnung. Allerdings sind die Auswirkungen nicht so dramatisch wie bei den analogen Mutanten von BR. Dort war die Reprotonierung der Schiffbase bis zu 400-mal langsamer [70]. Falls dies ein notwendiger Schritt ist, um die Kanalöffnung von ChR2 zu induzieren, kann das bedeuten, dass die Schiffbase nicht durch H134 reprotoniert wird. Falls diese Reaktion in den ChR2-H134 Mutanten tatsächlich verzögert sein sollte, dann verläuft sie möglicherweise unabhängig von der Kanalöffnung.

4.2.2 E123 spielt eine zentrale Rolle bei allen Zustandsänderungen

E123Q

Bei E123Q fiel zunächst die deutlich reduzierte Kanalaktivität auf. Der Durchschnittswert des stationären Stroms betrug unter Referenzbedingungen etwa 10% der Wildtypamplitude. Das widerspricht der dargestellten E123Q Aktivität in Abb. 3.4.1, wo der stationäre Photostrom etwa 1/3 beträgt. Diese Abbildung ist aber eher qualitativ. Der Durchschnittswert von ChR2-WT wurde aus allen Messdaten, die über den gesamten Zeitraum der Dissertation angefallen sind, gebildet. Beim

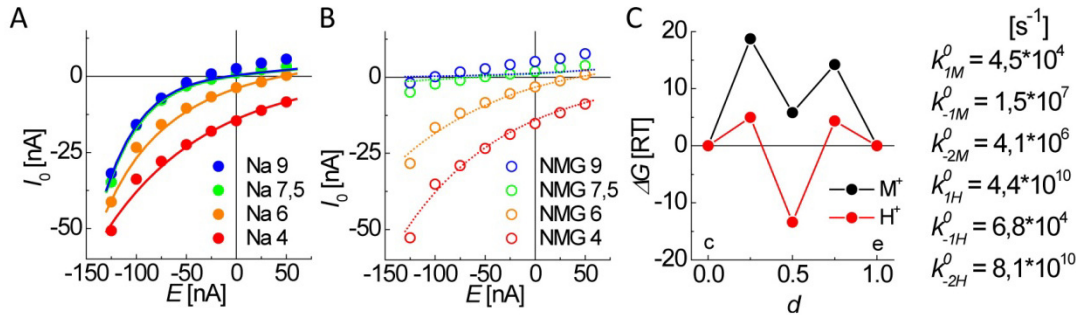


Abb. 4.2.9 Modellierung der IV-Kurven von E123Q mit dem Two Barrier Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -7,4 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_S bei Na 7,5/ -100 mV). **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von E123Q im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Die kleineren Photoströme führen im Vergleich zum Wildtyp zur Verringerung der Transportraten von monovalenten Kationen (M^+ : k_{1M} , k_{-2M}) und Protonen (H^+ : k_{1H} , k_{-2H}) zur Bindungsstelle. Dadurch werden insbesondere die Eintrittsbarrieren für M^+ höher. Wegen der niedrigen extrazellulären Eintrittsbarriere für Protonen ($k_{-2H} > k_{-2M}$), nimmt die Besetzungswahrscheinlichkeit von Protonen bei sinkendem pH_e zu und deren Anteil am Gesamteinstrom steigt. Durch den langsameren Protonentransport ($k_{-1H} < k_{-1M}$) ins Cytosol nimmt er aber nur relativ schwach zu.

direkten Vergleich zwischen beiden Konstrukten war die Amplitude des Wildtyps tatsächlich viel größer als die von E123Q [71].

Im Gegensatz zu den H134 Mutanten nahmen die Einstöme mit zunehmender extrazellulärer Protonenkonzentration zu (Abb. 3.4.2). Nach dem *Two Barrier* Modell sind die Transportraten für die Übergänge zur Ionenbindungsstelle sowohl von extrazellulärer Seite ($k_{-2M}^0 = 4,1 \cdot 10^6$ s⁻¹; $k_{-2H}^0 = 8,1 \cdot 10^{10}$ s⁻¹) als auch von cytosolischer Seite ($k_{1M}^0 = 4,5 \cdot 10^4$ s⁻¹; $k_{1H}^0 = 4,4 \cdot 10^{10}$ s⁻¹) kleiner als beim Wildtyp (Abb. 4.2.9). Das erklärt den reduzierten Ladungstransport. Der Transport von Protonen in das Cytosol ist, im Vergleich zu den anderen Übergängen, aber relativ schnell ($k_{-1H}^0 = 6,8 \cdot 10^4$ s⁻¹). Die relativ hohe Protonenpermeabilität führte zu einer eindeutigen Zunahme des Einstroms von Ladungsträgern bei sinkenden pH_e-Werten.

E123 befindet sich in Chr2 an der Position, an der in BR D85 lokalisiert ist (Abb. 1.8). Dort ist dieser Rest im Grundzustand negativ geladen und der primäre Protonenakzeptor der Schiffbase. Er ist damit ein essentieller Teil der *active site* und der Protonenleitungskette [2]. Die BR Mutante D85N zeigte einen verlangsamten Photozyklus, verursacht durch die etwa 100-mal langsamere Deprotonierung der Schiffbase und praktisch keine Pumpaktivität mehr [52]. Daher ist die Reduzierung der Kanalaktivität von Chr2-E123Q tatsächlich überraschend schwach. Außerdem waren sämtliche Kanalkinetiken bis hin zur *Recovery* Kinetik gegenüber dem Wildtyp signifikant beschleunigt (Abb. 3.4.5). Die meisten Übergänge im 4-Zustandsmodell verlaufen daher ebenfalls schneller (Abb. 4.2.10). Das führt auch zu einem relativ hohen Anteil von O1 im Gleichgewicht unter neutralen Bedingungen. Die Tatsache, dass die Öffnung und das Schließen des Kanals sowie die Übergänge in den jeweils anderen Zyklus beschleunigt waren,

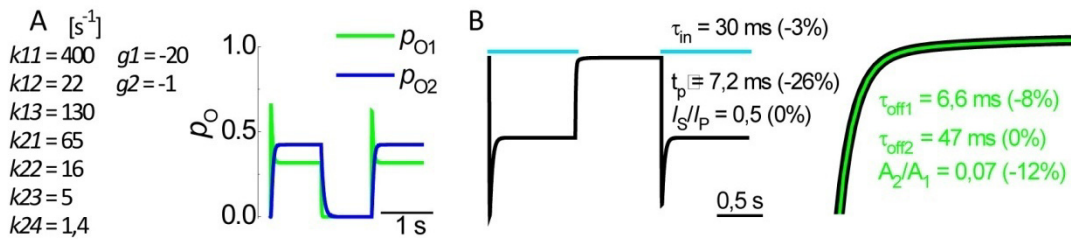


Abb. 4.2.10 Modellierung der E123Q Stromspuren bei pH_o 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell. (vgl. Abb. 4.1.6) **A** Geschwindigkeitskonstanten (k) und Leitfähigkeiten (g) sowie die Besetzungswahrscheinlichkeiten (p_O) von O1 und O2 im Doppelpulsexperiment. Gegenüber dem Wildtyp sind insbesondere der Zerfall von O1 (k_{13}) und die Übergänge O1→C2 (k_{12}) und O2→C1 (k_{22}) beschleunigt. Dadurch werden die Inaktivierung und *off*-Kinetik schneller, aber der Anteil von O1 auch höher als im Wildtyp. **B** Simuliertes Doppelpulsexperiment mit zwei Anregungspulsen (blaue Balken). Rechts: Vergrößerte *off*-Kinetik mit biexponentiellem Fit (grün). Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off1,2}$: τ -Werte der biphasischen *off*-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden von schneller und langsamer Komponente)

zeigt, dass diese sehr unterschiedlichen Vorgänge einer gemeinsamen Kontrolle unterliegen. Dabei muss E123 ein zentrales Element sein. Aus spektroskopischen Messungen ist bekannt, dass die Deprotonierung von Chr2-WT schnell und vor der Kanalöffnung stattfindet [22]. Diese Reaktion scheint wie bei BR ein zentrales Element des Aktivierungsmechanismus zu sein. Vergleichbare Messungen an E123Q stehen zwar noch aus, aber es ist unwahrscheinlich, dass angesichts der relativ hohen Aktivität diese Reaktion inhibiert ist. Unterstützt wird diese Annahme durch die Messungen an E123A und E123T, die ebenfalls schnelle Kinetiken haben und bei denen die Reduzierung der Kanalaktivität schwächer ist als bei E123Q. Möglicherweise fungiert bei Chr2 eine andere Aminosäure als Protonenakzeptor.

Wie bei BR-D85N verursachte die Mutation Chr2-E123Q eine deutliche Rotverschiebung des Aktionsspektrums (Abb. 3.4.19). Damit ist klar, dass die Schiffbase im Grundzustand weiterhin protoniert ist. Ein Faktor, der die Absorption des Chromophors beeinflusst, ist die elektrostatische Wechselwirkung der Schiffbase mit dem komplexen Gegenion. Je stärker diese Interaktion ist, umso mehr verschiebt sich das Absorptionsmaximum in Richtung kürzerer Wellenlängen [52]. Der Austausch eines im Grundzustand negativ geladenen Glutamats gegen ein neutrales Glutamin schwächt höchstwahrscheinlich die Wechselwirkung der Schiffbase mit dem Gegenion. Ein weiterer Faktor ist die Polarisierung entlang des Chromophors. Eine große Differenz zwischen den elektrostatischen Potentialen an der Schiffbase und am β -Iononring bewirkt eine Blauverschiebung des Absorptionsmaximums. Dies kann z.B. durch eine hohe Zahl polarer Reste in der Nähe der Schiffbase und viele unpolare Reste am β -Iononring verursacht werden [45]. Der Austausch von Glutamat gegen Glutamin hat bei E123Q möglicherweise die Polarisierung des Retinals verringert.

Bei Chr2-WT verlangsamte sich nach der Laserblitzaktivierung der Schließvorgang bei positiveren Membranpotentialen. Bei E123Q blieb die *off*-Kinetik unabhängig von der Membranspannung schnell (Abb.3.4.4-C). Daher

wurden die Unterschiede zwischen den Kinetiken von ChR2-WT und E123Q mit positiveren Spannungen größer. Bei einer negativen Spannung, jenseits des Messbereichs, hätten beide Varianten wahrscheinlich eine ähnliche Kinetik. Daher kann ein Großteil der schnellen E123Q Kinetik ihrer fehlenden Spannungsabhängigkeit zugeschrieben werden. Diese Abhängigkeit muss mit der Translokation einer Ladung einhergehen, zum Beispiel dem Transport einer positiven Ladung in Richtung Cytosol oder dem Transport einer negativen Ladung in Richtung Außenmedium. Dies könnte der Transfer eines Protons oder die Umlagerung einer geladenen Seitengruppe sein. In beiden Fällen könnte die Entfernung einer negativen Ladung in der Nähe der Schiffbase diese Vorgänge beschleunigen. Durch die Studien mit den E123 Mutanten ist die Funktion dieses Glutamats als Protonenakzeptor zumindest fraglich. Daher könnte dieser Rest auch während des gesamten Photozyklus deprotoniert bleiben. Falls die Öffnung und das Schließen des Kanals mit der Umlagerung dieser negativen Position einhergehen, kann der Austausch zum ungeladenen Glutamin zu einer Beschleunigung dieser Vorgänge führen. Falls es in ChR2-WT zur Umlagerung des Glutamats kommt, müsste dieser Prozess durch das elektrische Feld in eine Richtung beschleunigt und die andere Richtung verzögert werden. Bei dieser einfachen Annahme hätte die Mutation zu E123Q auch die signifikante Verlangsamung eines Übergangs bewirken müssen. Stattdessen waren fast alle Übergänge signifikant beschleunigt. Der Einfluss von E123 auf die Kanalkinetiken zeigt, dass die Prozesse, die mit dieser Position in Verbindung stehen, komplexerer Natur sind und mehrere Faktoren eine Rolle spielen. Zum Beispiel könnten die Übergänge zwischen den Intermediaten auch von der Isomerisierung des Retinals oder größeren Konformationsänderungen abhängen. Eine strukturelle Änderung des komplexen Gegenions könnte daher auch diese Prozesse beeinflussen. Hier würden Messungen von E123Q mit FTIR oder Ramanspektroskopie genauere Antworten liefern.

E123D

Auch wenn die I_0 Amplituden kleiner als beim Wildtyp waren, zeigten sie eine ähnliche pH_e -Abhängigkeit (Abb. 3.4.6). Dabei gab es jedoch einen großen Unterschied zwischen I_0 und I_S . Der Einstrom nahm in der stationären Phase bei sinkenden pH_e wesentlich stärker zu als beim Wildtyp. Das kleine Verhältnis von stationärem zu transientem Strom unter neutralen Bedingungen, das bereits von Nagel et. al beschrieben wurde [1], konnte hier bestätigt werden (Abb. 3.4.9-E). Es spricht dafür, dass sich mehr Moleküle im zweiten Zyklus des 4-Zustandsmodells befinden. Diese These wird durch den hohen Anteil der langsamen Komponente an der *off*-Kinetik gestützt ($A_2/A_1 = 0,13$). Nach Modellierung verläuft insbesondere der Übergang von O2 \rightarrow C1 ($k_{22} = 3 \text{ s}^{-1}$) verzögert ab (Abb. 4.2.12). Wodurch der τ -Wert der langsamen Komponente (τ_2) größer wurde, was auch der experimentellen Beobachtung entspricht (Abb. 3.4.9-G). Allerdings konnte der tatsächliche Wert von τ_2 nicht ganz erreicht werden. Die besonders starke pH_e -Abhängigkeit der I_S Amplituden bei -100 mV kann nun dadurch erklärt werden,

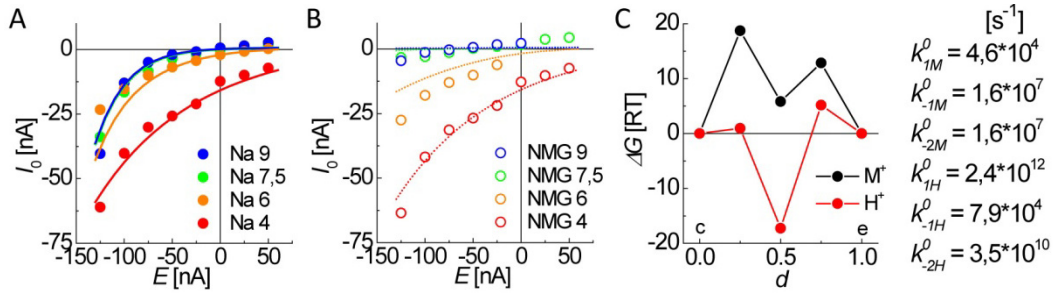


Abb. 4.2.11 Modellierung der IV-Kurven von E123D mit dem Two Barrier Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -3,2 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_S bei Na 7,5/ -100 mV). **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von E123D im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Die kleineren Photoströme führen im Vergleich zu ChR2-WT zu kleineren Transportraten beim Übertritt vom Außenmedium zur Bindungsstelle (M^+ : k_{-2M} , H^+ : k_{-2H}). Dadurch werden die Eintrittsbarrieren höher. Da der Transport von H^+ vom Außenmedium zur Bindungsstelle schneller verläuft als der von M^+ ($k_{-2H} > k_{-2M}$), nimmt die Besetzungswahrscheinlichkeit von Protonen bei sinkendem pH_e zu. Die Zunahme des Gesamteinstroms ist aber relativ schwach, da der Protonentransport von der Bindungsstelle ins Cytosol langsamer verläuft als der von M^+ ($k_{-1H} < k_{-1M}$).

dass sich bei E123D unter sauren Bedingungen das Gleichgewicht zunehmend in Richtung O1 verschiebt und dadurch der Anteil des stationären Stroms wächst.

Ein Beitrag zur ungewöhnlichen, positiven Verschiebung des Umkehrpotentials von I_0 unter physiologischen Bedingungen kann nur von Na^+ oder Ca^{2+} stammen (Abb. 3.4.7-D). Beide Ionenspezies haben unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ein positives Umkehrpotential ($V_r(Na^+) = +72$ mV, $V_r(Ca^{2+}) = +75$ mV). Demnach wäre bei E123D entweder das Verhältnis der Permeabilität von Na^+ zu K^+ größer als beim Wildtyp oder die Permeabilität von Ca^{2+} gegenüber monovalenten Kationen hat zugenommen. Der relative große Einstrom bei -100 mV in NMG-Cl (Abb. 3.4.7-A) spricht eher für einen höheren Ca^{2+} Anteil.

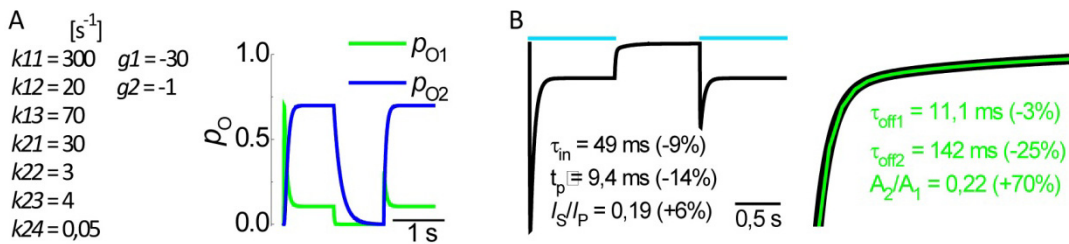


Abb. 4.2.12 Modellierung der E123D Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell. (vgl. Abb. 4.1.6) **A** Geschwindigkeitskonstanten (k) und Leitfähigkeiten (g) sowie die Besetzungswahrscheinlichkeiten (p_O) von O1 und O2 im Doppelpulsexperiment. Der schnelle Übergang $O1 \rightarrow C2$ (k_{12}) und der langsame Übergang $O2 \rightarrow C1$ (k_{22}) führen zu einer Akkumulation von O2. Um den Anteil des stationären Stroms weiter zu verringern, musste die Leitfähigkeit von O2 (g_2) gegenüber O1 (g_1) reduziert werden. **B** Simuliertes Doppelpulsexperiment mit zwei Anregungspulsen (blaue Balken). Rechts: Vergrößerte off-Kinetik mit biexponentiellem Fit (grün). Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. Der Anteil der langsamen Komponente der off-Kinetik liegt deutlich über den experimentellen Werten. Eine Reduktion würde aber zur Anhebung des Verhältnisses I_S/I_P führen. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off1,2}$: τ -Werte der biphasischen off-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden von schneller und langsamer Komponente)

Aus dem *Two Barrier* Modell ergeben sich relativ langsame Transportraten für den Übertritt von Kationen vom Cytosol und Außenmedium zur Ionenbindungsstelle ($k_{1M}^0 = 4,6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$; $k_{-2M}^0 = 1,6 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$), die sich auf die kleinen Stromamplituden von E123D zurückzuführen sind (Abb. 4.2.11).

Im Aktionsspektrum konnte ich nur eine schwache Rotverschiebung von etwa 7 nm messen, die möglicherweise auf eine schwächere Wechselwirkung der kürzeren Seitengruppe von Aspartat mit der Schiffbase zurückgeht (Abb. 3.4.19).

E123T

Mit dieser Mutation wurde bei ChR2 ein zentraler Bestandteil des aktiven Zentrums der Chloridpumpe Halorhodopsin rekonstruiert. Dass dieses Threonin maßgeblich an der Umwandlung einer Protonen- in eine Chloridpumpe beteiligt ist, konnte durch die BR Mutante D85T gezeigt werden, die unter bestimmten Voraussetzungen ebenfalls Chlorid pumpt [53,54].

Die phänomenologischen Eigenschaften von ChR2-E123T hatten eine gewisse Ähnlichkeit mit E123Q. Zum Beispiel waren alle messbaren Kanalkinetiken sehr schnell (Abb. 3.4.13). Eine weitere Gemeinsamkeit mit E123Q waren die gut separierten Strom/Spannungskurven, die sich innerhalb des Messbereichs nicht überschneiden (Abb. 3.4.10) und auf eine hohe Protonenpermeabilität hindeuten. Allerdings waren die Stromamplituden von E123T dreimal größer und lagen damit in der Größenordnung von ChR2-WT. Hier muss allerdings hinzugefügt werden, dass in dem Zeitraum, in dem die E123 Mutanten charakterisiert wurden, die E123T Stromamplituden tatsächlich nur etwa 2/3 der Stromamplituden des Wildtyps betrugen. Der Durchschnittswert vom Wildtyp in Abb. 3.4.1 beinhaltet alle Messdaten, die während der Dissertation aufgenommen wurden und unterlag größeren Schwankungen.

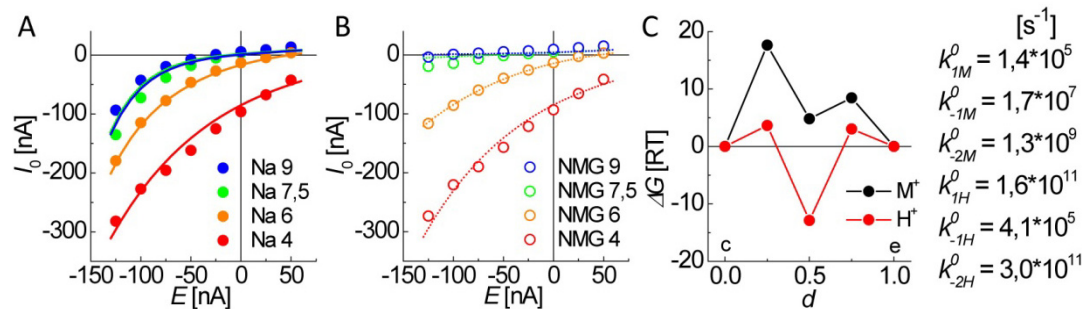


Abb. 4.2.13 Modellierung der IV-Kurven von E123T mit dem *Two Barrier* Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -21,5 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_s bei Na 7,5/ -100 mV). **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von E123T im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Die Transportraten von monovalenten Kationen (M^+) vom Außenmedium (k_{-2M}) zur Bindungsstelle und von dort ins Cytosol (k_{1M}) sind größer als beim Wildtyp. Der Protonentransport ins Cytosol (k_{2H} , k_{1H}) verläuft bei E123T ebenfalls schneller. Die Verweildauer von Ladungsträgern am Kanal wird dadurch kürzer. Da die extrazelluläre Eintrittsbarriere für H^+ kleiner ist als die für M^+ ($k_{2H} > k_{2M}$), steigt die Besetzungsdichte von Protonen bei sinkendem pH_e . Da der Protonentransport ins Cytosol (k_{1H}) im Vergleich zum Wildtyp schnell ist, nimmt der Gesamteinstrom relativ deutlich zu.

Nach dem *Two Barrier* Modell sind die Transportraten für Kationen vom Cytosol zur Ionenbindungsstelle größer als bei E123D und E123Q ($k_{-2M}^0 = 1,2 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$). Daraus resultiert unter neutralen und basischen Bedingungen auch ein höherer Natriumeinstrom. Da die Eintrittsbarrieren für Protonen kleiner sind als für Kationen, nimmt deren Besetzungsdichte am Kanal bei sinkenden pH_e -Werten zu. Das Energieprofil zeigt bei E123T einen schnelleren Transport von Protonen von der Ionenbindungsstelle in das Cytosol als beim Wildtyp ($k_{-IH}^0 = 4,1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) (Abb. 4.2.13). Dadurch steigt die Permeabilität von Protonen und ihre inhibitorische Wirkung nimmt ab.

Auffällig war zudem das deutlich negativere Umkehrpotential von I_0 gegenüber $V_i(I_S)$ bei pH_e 7,5 in NMG-Cl (Abb. 3.4.11-C). Das spricht für eine höhere Kationenselektivität in der Anfangsphase als in der stationären Phase, da bei NMG $_e$ / pH_e 7,5 der negative Beitrag zum Umkehrpotential vor allem aus dem Kaliumgradienten resultiert.

Nach dem 4-Zustandsmodell ist der Übergang $O1 \rightarrow C2$ ($k_{12} = 44 \text{ s}^{-1}$) unter neutralen Bedingungen extrem schnell (4.2.14). Dadurch wird der Anteil von O2 gegenüber O1 im Gleichgewicht größer als beim Wildtyp, wodurch der hohe Anteil der langsamen Komponente (A_2) am stationären Strom erklärt werden kann. Neben $O1 \rightarrow C2$ sind auch alle weiteren Übergänge bei E123T signifikant beschleunigt.

In Halorhodopsin und BR-D85T ersetzt ein Chloridion in der Nähe der Schiffbase die negative Ladung, die sonst durch D85 bereitgestellt wird [54,72]. Beide Konstrukte pumpen Chlorid in das Cytosol, wobei die SB normalerweise nicht deprotoniert wird. Allerdings liegt im Grundzustand und unter neutralen Bedingungen die Schiffbase von BR-D85T zum Teil deprotoniert vor, was durch ein zweites Absorptionmaximum bei 410 nm bestätigt wurde. Das Absorptionsmaximum der protonierten Spezies ist gegenüber BR rotverschoben und liegt bei 607 nm. Nach Lichtanregung erfolgt der Transport des Chlorids ohne

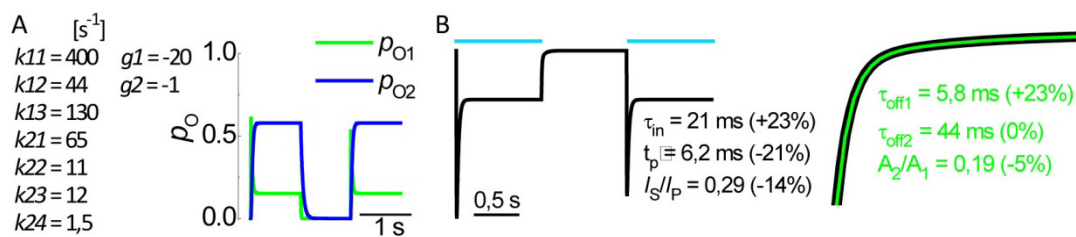


Abb. 4.2.14 Modellierung der E123T Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell. (vgl. Abb. 4.1.6) **A** Geschwindigkeitskonstanten (k) und Leitfähigkeiten (g) sowie die Besetzungswahrscheinlichkeiten (p_O) von O1 und O2 im Doppelpulsexperiment. Der Übergang $O1 \rightarrow C2$ (k_{12}) ist gegenüber ChR2-WT extrem beschleunigt. Dadurch wird die Inaktivierung sehr schnell. Es kommt aber zu keiner übermäßigen Akkumulation von O2, da der Übergang $O2 \rightarrow C1$ (k_{22}) ebenfalls schneller abläuft. Außerdem sind die Übergänge $O1 \rightarrow C1$ (k_{13}) und $O2 \rightarrow C2$ (k_{23}) deutlich schneller, was zur Beschleunigung der *off*-Kinetik führt. **B** Simuliertes Doppelpulsexperiment mit zwei Anregungspulsen (blaue Balken). Rechts: Vergrößerte *off*-Kinetik mit biexponentiellem Fit (grün). Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off1,2}$: τ -Werte der biphasischen *off*-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden von schneller und langsamer Komponente)

die Entstehung einer deprotonierten Spezies. Ein Großteil der Rotverschiebung wurde der veränderten elektrostatischen Interaktion der Schiffbase mit dem Chlorid zugeschrieben, dass sich in der Nähe der Schiffbase befindet und deren negativen Gegenpol darstellt. Das Absorptionsmaximum von ChR2-E123T war um ca. 30 nm rotverschoben, was auf die Bindung von Chlorid in der Nähe der Schiffbase hindeuten könnte (Abb. 3.4.19). Bei den spektroskopischen Messungen von BR-D85T wurde festgestellt, dass sowohl das Absorptionsmaximum als auch die Kinetik des Photozyklus von der Halidkonzentration abhängen [73]. Solche Messungen stehen für ChR2-E123T noch aus. Bei den elektrophysiologischen Messungen konnte ich keine Veränderung bei der Kanalkinetik in Abwesenheit von extrazellulärem Chlorid feststellen (Abb. 3.4.14). Hier gab es wie beim Wildtyp eine Reduktion des Einstroms und eine negative Verschiebung des Umkehrpotentials. Das spricht zwar gegen den Transport von Chlorid, aber es könnte eine Rolle bei der Aktivierung spielen. Da dieser Effekt auch beim Wildtyp auftrat, stellt sich deshalb die Frage, ob sich auch hier Chlorid in der Nähe der Schiffbase bindet. Endgültige Klarheit würden spektroskopische Messungen mit variierenden Halidspezies und -konzentrationen bringen. Erste UV/Vis-Messungen an E123T/H134R zeigten aber, dass die Schiffbase nach Lichtanregung deprotoniert (Katja Stehfest und Stefanie Kathe, unpubliziert). Dies schwächt die These der Halidbindung, da sowohl bei HR als auch bei BR-D85T die Schiffbase nur dann ihr Proton abgibt, wenn sich kein Chlorid in der Nähe befindet [72,73].

E123A

Diese ChR2 Mutante zeichnete sich durch relativ große Stromamplituden aus (Abb. 3.4.1). Die Strom/Spannungskurven des Anfangsstroms überschneiden sich nicht und zeigen auch in NaCl eine deutliche pH_e -Abhängigkeit (Abb. 3.4.15). Die inhibitorische Wirkung von Protonen auf den Kationenstrom muss dementsprechend schwächer sein als beim Wildtyp. Nach dem *Two Barrier* Modell hat E123A relativ kleine Geschwindigkeitskonstanten beim Transport von Kationen zur Ionenbindungsstelle ($k_{\text{IM}}^0 = 5,5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{-2M}}^0 = 4 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$) (Abb. 4.2.15). Unter neutralen und basischen Bedingungen ist der Natriumeinstrom dennoch vergleichsweise groß, weil deren Weitertransport in das Cytosol sehr schnell erfolgt ($k_{\text{-IM}}^0 = 1 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$). Trotzdem sinkt die Besetzungsdichte von Kationen mit sinkenden pH_e Werten, da sie von Protonen, aufgrund der niedrigeren Eintrittsbarrieren, zunehmend von der Bindungsstelle verdrängt werden. Allerdings erfolgt deren Transport in das Cytosol ($k_{\text{-IH}}^0 = 5 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) schneller als beim Wildtyp. Dadurch ist die Protonenpermeabilität höher und der Einstrom nimmt unter sauren Bedingungen zu.

Erwartungsgemäß sind alle Übergänge im 4-Zustandsmodell schneller als beim Wildtyp (Abb. 4.2.16). Offensichtlich übt E123A einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Zustandsänderungen aus. Das betrifft vor allem die Übergänge zwischen den zwei Zyklen ($k_{12} = 33 \text{ s}^{-1}$, $k_{22} = 21 \text{ s}^{-1}$, $k_{24} = 1,4 \text{ s}^{-1}$). Das Verhältnis von k_{12} zu k_{22} war bei E123A kleiner als bei E123T, wodurch der Anteil von O1 bei E123A höher war. Dadurch stieg das Verhältnis von I_S zu I_0 (Abb. 3.4.18-E).

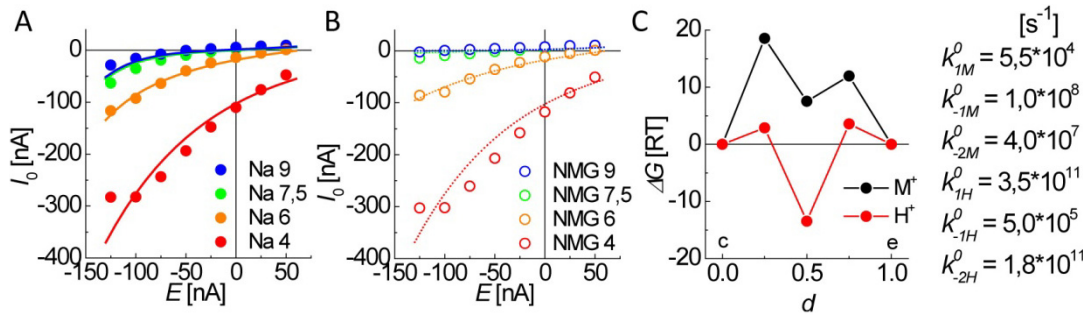


Abb. 4.2.15 Modellierung der IV-Kurven von E123A mit dem Two Barrier Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -18,2 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_S bei Na 7,5/ -100 mV). **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von E123A im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Die Eintrittsbarrieren für monovalente Kationen (M^+) sind relativ hoch (k_{1M} , k_{-2M}). Dafür werden sie schnell von der Ionenbindungsstelle transportiert (k_{-1M}). Da die extrazelluläre Eintrittsbarriere für Protonen (H^+) kleiner ist als die für M^+ ($k_{2H} > k_{-2M}$), steigt der Anteil von Protonen am Einstrom bei sinkendem pH_e . Die Protonentransportrate von der Bindungsstelle ins Cytosol (k_{1H}) ist doppelt so groß wie von ChR2. Dadurch ist die Zunahme des Gesamteinstroms bei sinkendem pH_e relativ deutlich.

Aus Abb. 3.4.17-D geht hervor, dass die *off*-Kinetik von E123A nach Laseraktivierung, im Gegensatz zu E123Q und E123T spannungsabhängig ist. Alanin ist eine ungeladene und unpolare Aminosäure. Daher ist dieser Unterschied zu der Glutamin- und Threoninmutante etwas überraschend und ich nehme an, dass die Spannungsabhängigkeit der Wildtypkinetik nur indirekt mit E123 verknüpft ist. Möglicherweise werden Ladungstransfers in unmittelbarer Nachbarschaft beeinflusst. Glutamin und Threonin sind polare Aminosäure. Ihre partiellen Ladungen reichen möglicherweise aus, um das komplexe Gegenion zu stabilisieren. Das nur geringfügig verschobene Spektrum von E123A weist darauf hin, dass die

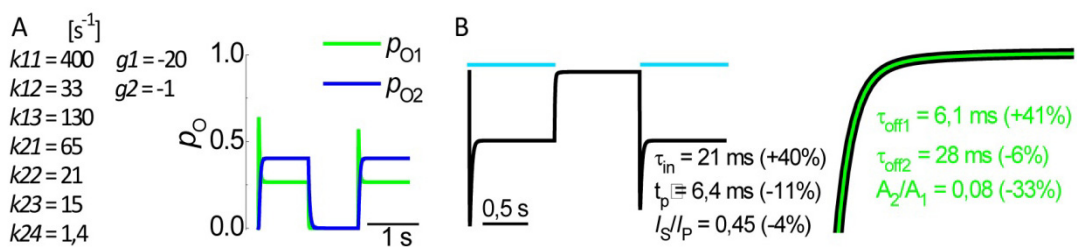


Abb. 4.2.16 Modellierung der E123A Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell. (vgl. Abb. 4.1.6) **A** Geschwindigkeitskonstanten (k) und Leitfähigkeiten (g) sowie die Besetzungswahrscheinlichkeiten (p_O) von O1 und O2 im Doppelpulsexperiment. Der Übergang O1 \rightarrow C2 (k_{12}) ist gegenüber ChR2-WT stark beschleunigt. Der Übergang O2 \rightarrow C1 (k_{22}) ist ebenfalls sehr schnell, was insgesamt zu einer sehr schnellen Inaktivierung und einer stärkeren Population von O1 führt. Dadurch wird der Anteil des stationären Stroms relativ groß. Außerdem sind die Übergänge O1 \rightarrow C1 (k_{13}) und O2 \rightarrow C2 (k_{23}) deutlich schneller, was zur Beschleunigung der *off*-Kinetik führt. **B** Simuliertes Doppelpulsexperiment mit zwei Anregungspulsen (blaue Balken). Rechts: Vergrößerte *off*-Kinetik mit biexponentiellem Fit (grün). Die Prozentangaben kennzeichnen die Abweichung der simulierten Kinetiken von den experimentellen Daten. (τ_{in} : τ -Wert der Inaktivierung, t_p : Dauer vom Anregungsbeginn bis zu I_P , I_P : transienter Strom, I_S : stationärer Strom, $\tau_{off1,2}$: τ -Werte der biphasischen *off*-Kinetik, $A_{1,2}$: Amplituden von schneller und langsamer Komponente)

elektrostatischen Wechselwirkungen der Schiffbase mit dem komplexen Gegenion stärker sind als bei E123T und E123Q. Das wäre ebenfalls überraschend, aber bei E123A könnten polare Wassermoleküle oder sogar ein Chloridion die positive Ladung der Schiffbase stabilisieren. Die Mutante BR-D85A zeigte gegenüber dem BR-Wildtyp eine mehr als 100-mal langsamere Deprotonierung der Schiffbase und praktisch keine Pumpaktivität mehr [52]. Allerdings lassen die Kanalaktivität und Kinetiken von E123A vermuten, dass die Schiffbase weitgehend ungehindert deprotoniert. Hier sollten spektroskopische Messungen im UV/Vis-Bereich ein endgültiges Resultat liefern.

Fazit E123

Bei den E123 Mutanten waren die Kinetiken entweder größtenteils beschleunigt (E123Q, T, A) oder verlangsamt (E123D). Dies betraf $O1 \rightarrow C1$ und $O2 \rightarrow C2$ sowie die drei Übergänge zwischen den beiden Zyklen des 4-Zustandsmodells. Das zeigt, dass diese Prozesse einer gemeinsamen Kontrolle unterliegen und E123 dabei eine zentrale Rolle spielt. Da sich E123 in der Mitte des Kanals und in unmittelbarer Nähe des Retinals befindet, können Mutationen hier viele Prozesse beeinflussen, wie zum Beispiel Protonentransfers, elektrostatische Wechselwirkungen oder die Retinalisomerisierung. All diese Vorgänge könnten die Übergänge zwischen den Intermediaten beeinflussen. Die Tatsache, dass die *off*-Kinetik von E123A spannungsabhängig war, obwohl Alanin eine unpolare Aminosäure ist, zeigt dass der Einfluss von E123 auf diese Prozesse auch nur indirekt sein kann. Zum Beispiel muss das Glutamat nicht unbedingt selbst geladen sein und als Spannungssensor zu fungieren, aber es könnte den Ladungszustand von Resten in der unmittelbaren Umgebung beeinflussen. Ebenso muss E123 nicht unbedingt selbst als Protonenakzeptor und –donor fungieren, könnte aber entsprechende Reaktionen in seiner Nachbarschaft beeinflussen. Eine direkte Verknüpfung der genannten Prozesse mit E123 war mit den experimentellen Befunden jedenfalls nicht möglich. Eine offene Frage bleibt, ob E123 im Grundzustand tatsächlich deprotoniert vorliegt und der primäre Protonenakzeptor der Schiffbase ist. Im Gegensatz zu BR haben die Einführung von Alanin oder Glutamin nicht zu einer Reduzierung der Aktivität geführt und E123T ist offensichtlich thermodynamisch stabiler als BR-D85T. Es könnte sein, dass die genannten Mutationen keine dramatische Reduzierung der Kanalaktivität verursachte, weil E123 bereits im Grundzustand protoniert und ungeladen vorliegt und nicht als primärer Protonenakzeptor der Schiffbase fungiert. Unter Umständen wird auch beim Wildtyp die negative Gegenladung der Schiffbase durch ein Chloridion bereitgestellt. Die Mutante E123L führte vielleicht deswegen zu einer starken Reduzierung der Aktivität, weil die Seitengruppe von Leucin die Bindung von Wassermolekülen oder Chlorid behindert (Abb. 3.4.20). Allerdings spricht gegen eine Halidbindung, dass bei HR und BR-D85T die Schiffbase nach Lichtanregung nicht deprotoniert, wenn sich Halide in deren Nähe befinden. Bei der Doppelmutante E123T/H134R war dies aber vermutlich der Fall, da nach Anregung ein blauverschobenes Intermediat

entstand (Stehfest, Kathe unpubliziert). Vermutlich deprotonieren die Schiffbasen von E123A und E123Q ebenfalls, auch wenn dies noch durch spektroskopische Messungen bestätigt werden muss. Ob Halide an der Schiffbase binden, könnte durch spektroskopische Messungen mit variierenden Halidkonzentrationen bestimmt werden.

Generell kann aus den Messungen aber abgeleitet werden, dass die Vorstellung über die Funktion des komplexen Gegenions nicht so einfach von BR auf ChR2 übertragen werden kann. Des Weiteren ergab die Modellierung der Strom/Spannungskurven mit dem *Two Barrier* Modell eine erhöhte Protonenpermeabilität bei E123T, E123A und E123Q. Möglicherweise führt die negative Ladung von E123 zu einer längeren Verweildauer von Protonen am Kanal, die durch die Substitution gegen Threonin, Alanin und Glutamin verkürzt wurde. Die Ladungsträger könnten also in der Nähe von E123 durch den Kanal geleitet werden.

4.2.3 D253 ist essentiell für die Kanalaktivierung und den Ladungstransport

D253N

D253 befindet sich in ChR2 an der Position, an der in BR D212 lokalisiert ist (Abb. 1.8). Dieser Rest bildet zusammen mit BR-D85 das komplexe Gegenion. BR-D212N zeigte zwar eine verlangsamte Deprotonierung, aber im Gegensatz zu BR-D85N kein rotverschobenes Spektrum. Daher wurde angenommen, dass die Wechselwirkungen von BR-D212 mit der Schiffbase und dessen Beitrag zur Stabilisierung des komplexen Gegenions geringer sind [52].

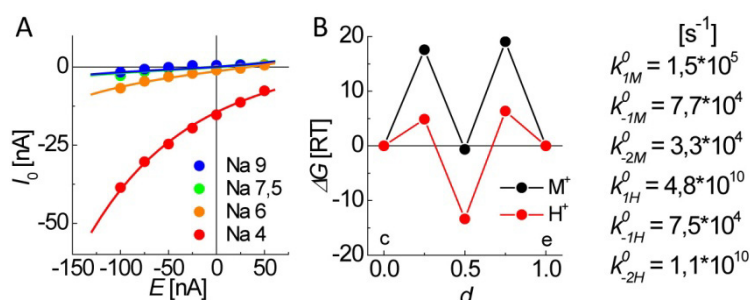


Abb. 4.2.17 Modellierung der IV-Kurven von D253N mit dem *Two Barrier* Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -1,6 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_S bei Na 7,5/ -100 mV). **B** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von D253N im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Wegen der kleinen Photoströme sind die Transportraten von monovalente Kationen (M^+) und Protonen (H^+) zur Bindungsstelle deutlich kleiner als beim Wildtyp, was zu hohen Eintrittsbarrieren führt. Ebenso sind die Transportraten von der Ionenbindungsstelle kleiner, was insbesondere zu einer starken Bindung von M^+ führt. Die deutliche Zunahme des Einstroms resultiert daher, dass der Transport von M^+ ins Cytosol auf das Niveau des Protonentransports abgesunken ist ($k_{-1H} \approx k_{-1M}$). Die Konkurrenz um die Bindungsstelle ist damit nicht so offensichtlich. Bei zunehmender extrazellulärer Protonenkonzentration nimmt der Einstrom stark zu, weil das Blockieren von M^+ nicht zur Schwächung des Gesamteinstroms führt.

Unter physiologischen Bedingungen zeigte ChR2-D253N eine stark reduzierte Kanalaktivität (Abb. 3.5.1), so dass ich zunächst davon ausging, dass dieses Konstrukt inaktiv ist. Allerdings nahmen die Stromamplituden bei pH_e 4 drastisch zu und waren größer als beispielsweise bei E123Q. Das Konstrukt war also funktionsfähig (Abb. 3.5.2). Aus diesen Experimenten geht nicht hervor, ob es sich dabei um ein Transportphänomen oder um eine pH-abhängige Aktivierung des Kanals handelt.

Die Mutation könnte das komplexe Gegenion destabilisieren und die Aktivierung des Kanals verhindern. Möglicherweise liegt die Schiffbase von D253N bereits im Grundzustand deprotoniert vor. Durch den hohen Protonierungsgrad unter sauren Bedingungen könnte die Schiffbase, über einen unbekannten Mechanismus wieder stabilisiert und damit die Aktivierung des Kanals möglich werden. Endgültige Klarheit über die Vorgänge am komplexen Gegenion von D253N würden spektroskopische Messungen dieser Variante bringen. Die Mutation wirkte sich unter physiologischen Bedingungen jedenfalls wesentlich stärker auf die Kanalaktivität aus als dies bei E123Q der Fall war und könnte bedeuten, dass D253 einen größeren Beitrag zum komplexen Gegenion leistet. Allerdings bleibt unklar warum die Stromamplituden von D253N unter sauren Bedingungen so deutlich zunahmen und größer wurden als die von E123Q. Falls dies ein Transportphänomen ist, könnte D253 eine größere Bedeutung für den Ionentransport haben als E123. Nach dem *Two Barrier* Modell sind die Übergänge zur Ionenbindungsstelle sowohl für Kationen als auch für Protonen sehr viel langsamer als beim Wildtyp (Abb. 4.2.17). Außerdem nimmt insbesondere die Geschwindigkeitskonstante für den Weitertransport von Kationen in das Cytosol ab, die auf dem Niveau des Protonentransports liegt. Daher könnte D253 eine interne Ionenbindungsstelle für Kationen sein. Durch die Entfernung der negativen Ladung wird deren Affinität gegenüber positiven Ladungsträgern geschwächt und der Ionentransport reduziert. Erst durch einen sehr großen pH-Gradienten, wie bei pH_e 4 kommt es zur Zunahme des Einstroms durch den Transport von Protonen. Die Strom/Spannungskurven von D253N werden nach diesem Modell sehr gut wiedergegeben.

Bei D253E beobachtete ich eine wesentlich stärkere Reduktion des Ionenstroms als bei D253N (Abb. 3.5.3). Nach der Transporthypothese könnten ungünstige sterische Wechselwirkungen der längeren Seitengruppe von Glutamat mit Wassermolekülen und Kationen zu einer Reduktion des Protonen- und Kationentransports führen. Das impliziert aber auch, dass D253 Teil der Ionenpore ist.

4.2.4 E235 als extrazellulär gelegene Ionenbindungsstelle

E235Q

An der Position von ChR2-E235 befindet sich in BR-E194 (Abb. 1.8). Dieses Glutamat ist dort Teil der sogenannten *proton release group*, über die das gepumpte Proton in das Außenmedium abgegeben wird [18,55].

Die Mutation zu Glutamat führte unter physiologischen Bedingungen zu einer deutlichen Reduzierung der Stromamplituden im Vergleich zu ChR2-WT (Abb. 3.5.1). Wie bei D253N nahm der Einstrom unter sauren extrazellulären Bedingungen sehr stark zu (Abb. 3.5.4). Nach dem *Two Barrier* Modell sind sowohl für Protonen als auch für Kationen die Übergänge zur Ionenbindungsstelle sehr langsam (Abb. 4.2.18). Zudem ist die Geschwindigkeit des Kationentransports von Bindungsstelle in das Cytosol sogar langsamer als der Protonentransport. Bei einer Zunahme der extrazellulären Protonenkonzentration kann der Ladungstransport durch die steigende Protonendichte am Kanal daher nur zunehmen. Die genaue Lokalisation dieser Bindungsstelle im Kanal ist mit dem *Two Barrier* Modell nicht möglich. Tatsächlich wird es sogar mehrere davon geben, die hier zu einer einzelnen zusammengefasst werden. Es könnte jedoch sein, dass E235 durch seine negative Ladung eine extrazellulär gelegene Ionenbindungsstelle für positive Ladungsträger ist. Durch die Mutation zu Glutamin könnte die Position neutralisiert und dadurch die Bindung von positiven Ladungsträgern reduziert werden. Diese Annahme würde auch eine Erklärung für die Abnahme des Einstroms unter sauren Bedingungen bei ChR2-WT liefern. Nach dem *Two Barrier* Modell führt die Besetzung der Ionenbindungsstellen durch Protonen dort zu einer Reduzierung des Ladungstransports, trotz zunehmender Protonengradienten (vgl. Kap. 4.1.4). Wenn E235 eine dieser Positionen ist, könnte bei abnehmendem pH_e -Wert der Protonierungsgrad an diesem Rest zunehmen und

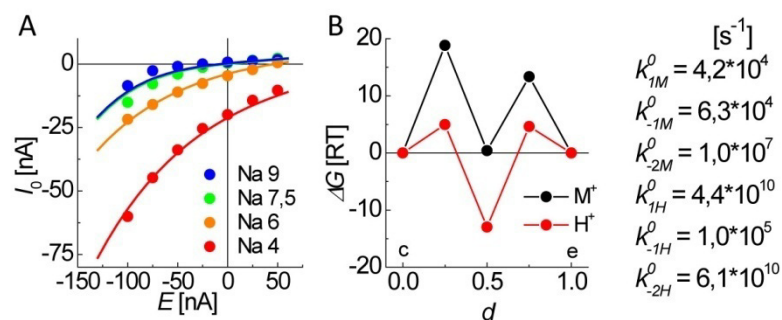


Abb. 4.2.18 Modellierung der IV-Kurven von E235Q mit dem *Two Barrier* Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -3,6 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_s bei Na 7,5/ -100 mV). **B** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von E235Q im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Die Transportraten von monovalenten Kationen (M^+) und Protonen (H^+) zur Bindungsstelle sind kleiner als beim Wildtyp, was zu hohen Eintrittsbarrieren führt. Bei E235Q ist der Transport von M^+ ins Cytosol langsamer als der Protonentransport ($k_{-1M} < k_{-1H}$). Daher nimmt der Gesamteinstrom bei sinkendem pH_e und höherer Besetzungsdichte des Kanals durch Protonen deutlich zu.

die Bindung und damit den Transport weiterer Protonen und Kationen reduzieren. Bei E235Q tritt diese Situation möglicherweise schon unter physiologischen Bedingungen auf. Daher kann es bei zunehmenden extrazellulärer Protonenkonzentration zu keiner Abnahme, sondern nur zu einer Zunahme des Einstroms kommen.

4.2.5 E90 ist ein zentraler Bestandteil des Protonentransports

E90Q

Erste Untersuchungen zu dieser Mutante hatte ich bereits in meiner Diplomarbeit gemacht. Wegen ihrer auffälligen Eigenschaften und der potentiell wichtigen Funktion von E90 beim Ionentransport, habe ich an dieser Position weitere Reste eingeführt und E90Q noch einmal intensiv untersucht.

Die größte Diskrepanz zum Wildtyp stellt der Nettoausstrom bei pH_e 4/ +50 mV dar, der aufgrund des großen Protonengradienten für einen Ausstrom von Kaliumionen spricht (Abb. 3.2.3-D). Leider war es nicht möglich dieses Verhalten mit dem gegebenen *Two Barrier* Modell zu simulieren. Daher erfolgt die Diskussion zunächst nur mit Bezug zu den experimentellen Befunden.

Da zwischen pH_e 9 und pH_e 6, mit Natriumionen im Außenmedium sowohl der Ein- als auch der Ausstrom abnahmen, sich das Umkehrpotential aber stetig in Richtung positiver Werte verschob, können wir im Vergleich zu Kationen von einer höheren Protonenaffinität der Bindungsstelle und kleineren Transportraten für Protonen ausgehen. Die Umkehrpotentiale lagen in NaCl gegenüber den Wildtypwerten bei allen pH_e -Werten näher bei 0 mV (Abb. 3.2.3-A). Daher ist die Protonenselektivität von E90Q kleiner als beim Wildtyp. Trotzdem sollte sich das Umkehrpotential bei pH_e 4 weiter in Richtung positiver Werte verschieben und der Ausstrom abnehmen. Stattdessen blieb das Umkehrpotential beim Wechsel von pH_e 6 auf pH_e 4 stabil und der Ausstrom sowie der Einstrom nahmen zu. Aus dem stabilen Umkehrpotential ergibt sich, dass bei pH_e 4 Protonen und Kationen in dem gleichen Verhältnis geleitet werden wie bei pH_e 6. Da die Protonenkonzentration im Außenmedium dabei aber 100-mal größer wurde, nehme ich an, dass die Affinität der Ionenbindungsstelle gegenüber Protonen bei pH_e 4 plötzlich abnimmt. Daher habe ich das Energieprofil des *Two Barrier* Modells zunächst mit den experimentellen Daten von pH_e 9, pH_e 7,5 und pH_e 6 berechnet (Abb. 4.2.19-A-C). Danach verlaufen die Übergänge zur Ionenbindungsstelle für Protonen sehr schnell ($k_{-2H}^0 = 5,9 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$). Mit den experimentellen Daten von pH_e 4 habe ich ein zweites Energieprofil berechnet (Abb. 4.2.19-D+E). Danach ist der Übertritt von Protonen zur Ionenbindungsstelle deutlich inhibiert ($k_{-2H}^0 = 2,9 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$). Dadurch verringert sich die Bindungswahrscheinlichkeit von Protonen erheblich.

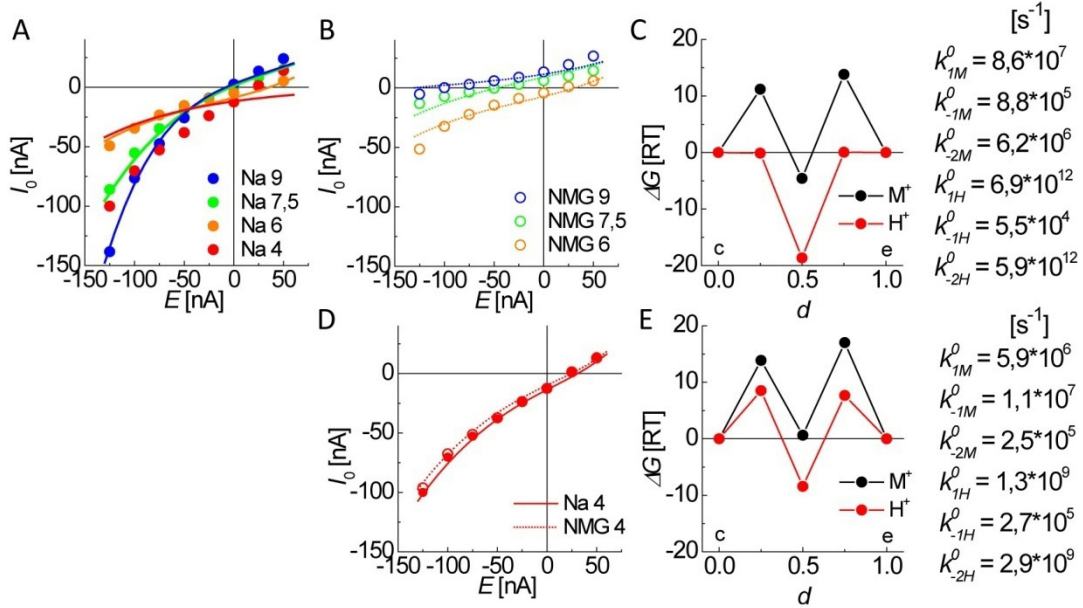


Abb. 4.2.19 Modellierung der IV-Kurven von E90Q mit dem Two Barrier Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) **A** Linien geben die Modellwerte von I_0 bei pH_e 9; 7,5; 6 und 4 wieder und stehen den experimentellen Daten in NaCl und **(B)** NMG-Cl gegenüber (Kreise). Die ursprünglich normierten Messwerte wurden mit -21,2 nA multipliziert (Experimenteller Durchschnittswert von I_S bei Na 7,5/ -100 mV). Die Modellierung erfolgte nur mit den Amplituden von pH_e 9, 7,5 und 6, die auch gut reproduziert werden konnten. **C** Energieprofil des Kationen- und Protonentransports von E90Q im elektrochemischen Gleichgewicht, abgeleitet aus den k^0 Werten (Geschwindigkeitskonstanten unter Gleichgewichtsbedingungen: beidseitig 1 M, 0 mV). Da die extrazelluläre Eintrittsbarriere für Protonen (H^+) sehr viel kleiner ist als die für Kationen (M^+) ($k_{-2H} > k_{-2M}$), nimmt die Besetzungswahrscheinlichkeit von Protonen bei sinkendem pH_e zu. Wegen der kleineren Protonentransportrate ($k_{-1H} < k_{-1M}$) nimmt der Gesamteinstrom aber ab. **D** Bei E90Q mussten die Strom/Spannungskurven von pH_e 4 separat modelliert werden. Mit den k^0 Werten der ersten Berechnung würden Einstrom und Ausstrom bei pH_e 4 weiter abnehmen und das Umkehrpotential positiver verschoben werden. **E** Das resultierende Energieprofil enthält eine dramatische Abnahme des Protonentransports unter sauren Bedingungen. Die Eintrittsbarrieren für Protonen (rot) werden höher und deren Bindung schwächer. Bei positiven Spannungen können trotz des hohen Protonengradienten intrazelluläre Kationen den Kanal besetzen und nach außen geleitet werden.

Das Verhältnis der Permeabilität von monovalenten Kationen zu Protonen (α) kann auch aus den Umkehrpotentialen berechnet werden (vgl. Kap. 4.1.1). Nach der modifizierten Goldmanngleichung gilt:

$$V_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]_e + \alpha[M^+]_e}{[H^+]_c + \alpha[M^+]_c}$$

$$\alpha = \frac{P_M}{P_H}$$

Bei Na_e/pH_e 6 beträgt $\alpha = 5,7 \cdot 10^{-6}$, steigt aber auf $\alpha = 5,1 \cdot 10^{-4}$ bei Na_e/pH_e 4. Hier hat die Protonenpermeabilität gegenüber Kationen also um fast das 100-fache abgenommen. Offensichtlich kommt es bei E90Q zur Veränderung der Ionenselektivität, wenn die Protonenkonzentration außen zunimmt. Der Effekt, bei dem die Bindung eines Ladungsträgers, die Bindung weiterer Ladungsträger

beeinflusst, ist mit dem Konzept einer einfachen Bindungsstelle nicht vereinbar [60]. Dafür müsste das *Two Barrier* Modell um mindestens eine Bindungsstelle erweitert werden. Die Diskussion darüber wird nachfolgend aber nur qualitativ geführt.

Bei pH_e 4 wird der Einstrom von Protonen getragen, während bei +50 mV Kaliumionen aus der Zelle strömen. Bei zwei Bindungsstellen (*Three Barrier* Modell) könnte die außen gelegene einen hohen Protonierungsgrad aufweisen und die Bindung von Natriumionen verhindern (Abb. 4.2.20). Gleichzeitig müsste aber auch der Protonentransport nach innen durch eine hohe Energiebarriere inhibiert sein, damit bei positiven Spannungen die interne Position von Kaliumionen besetzt werden kann. Der Unterschied zu dem *Two Barrier* Modell ist, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht zwischen dem Außenmedium beziehungsweise dem Cytosol und einer Ionenbindungsstelle liegt, sondern beim Übergang zwischen zwei Bindungsstellen stattfindet. Da die Wildtypströme mit dem *Two Barrier* Modell simuliert werden konnten, sind die internen Barrieren dort höchstwahrscheinlich niedriger als die äußeren. Es ist naheliegend, dass eine interne Barriere für den Protonentransport durch die Mutation E90Q erhöht wurde. Damit wurden zum einen eine potentiell negativ geladene Aminosäure und zum anderen ein potentieller Protonenakzeptor entfernt. Wenn E90 Teil der ionenleitende Pore ist, könnte beides zu einer Reduktion des Protonenstroms führen. Da die Amplitude des Photostroms von E90Q unter physiologischen Bedingungen weitgehend dem Wildtyp entsprach, scheint der Kationentransport durch die Mutation weitgehend ungestört zu verlaufen. Allerdings verhindert die Inhibition des Protonenstroms nicht deren Bindung an den äußeren Positionen. Dadurch konnte der Anteil von Protonen am Einstrom bei pH_e 6 bereits bei über

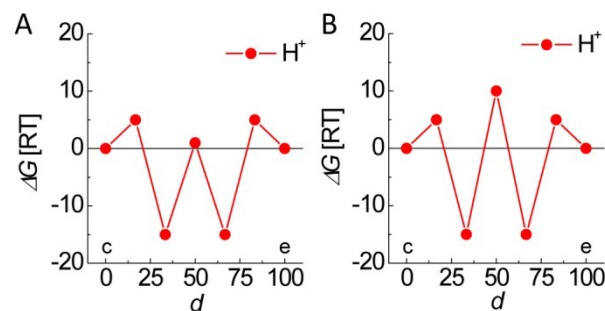


Abb. 4.2.20 Konzept eines *Three Barrier* Modells. **A** Hypothetisches Energieprofil für den Protonentransport (H^+) über zwei Bindungsstellen und drei Energiebarrieren. In ChR2 gibt es vermutlich mehrere cytosolische und extrazelluläre Bindungsstellen. Wahrscheinlich kann das einfache *Two Barrier* Modell deshalb zur Berechnung verwendet werden, weil die internen Übergänge schneller sind als die Übergänge ins Cytosol und Außenmedium, die damit geschwindigkeitsbestimmend sind. **B** Dagegen sind vermutlich bei den E90 Mutanten die internen Übergänge geschwindigkeitsbestimmend und das *Two Barrier* Modell kann für die Modellierung der Strom/Spannungskurven nicht verwendet werden. Offensichtlich ist insbesondere der Protonentransport betroffen. Bei pH_e 4 sind die externen Stellen vermutlich mit Protonen gesättigt. Bei positiven Spannungen könnte der nach innen gerichtete Transport aber derart verlangsamt werden, dass die internen Bindungsstellen trotz des hohen Protonengradienten nicht mehr von Protonen, sondern von cytosolischem K^+ besetzt werden, das durch das elektrische Feld nach außen geleitet wird. Mit dem *Two Barrier* Modell kann dies nicht simuliert werden, da es hier keine Trennung zwischen internen und externen Bindungsstellen gibt.

90% liegen. Offensichtlich hängt aber die Stärke der Protoneninhibition vom pH_e -Wert ab. Da bei pH_e 4 der Kaliumausstrom größer als bei pH_e 6 war, muss die interne Energiebarriere für Protonen hier größer sein, um eine stärker Separierung zwischen cytosolisch und extrazellulären Bindungsstellen zu erreichen. Da Q90 weder protoniert noch deprotoniert werden kann, hängt dies wahrscheinlich mit einem hohen Protonierungsgrad weiterer extrazellulär gelegener Reste zusammenhängen, die ebenfalls als Protonenakzeptoren fungieren könnten (z.B. K93, E97, E101). Die intrazellulären Ionenbindungsstellen sind bei pH_e 4/ +50 mV möglicherweise deprotoniert und können von Kaliumionen besetzt werden. Bei Bindung mehrerer Ionen auf der Innenseite, könnten sie durch gegenseitige Repulsion durch die Pore transportiert werden [74].

Von E90Q liegen bereits FTIR Daten vor, die von Franz Bartl und Egloff Ritter an der Charité Berlin aufgenommen wurden [22]. Dabei zeigte sich, dass E90 im Grundzustand einen hohen pK -Wert hat und protoniert vorliegt. Es gibt relativ starke Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen, die im Laufe des Photozyklus aber abnehmen. Möglicherweise ist ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung von ChR2, dass der pK -Wert von E90 gesenkt wird, um dadurch den Transport von Protonen zu ermöglichen oder durch dessen Deprotonierung eine Bindungsstellen für positive Ladungsträger zur Verfügung zu stellen. Vielleicht wird dadurch auch die Kanalöffnung kontrolliert.

Die Kinetik von E90Q ist insofern interessant, weil sowohl die Öffnung als auch das Schließen des Kanals schneller als beim Wildtyp waren (Abb. 3.2.4). Im Gegensatz zu den E123 Mutanten, kam es nur zu einer leichten Beschleunigung der *Recovery* Kinetik (Abb. 3.2.5). Deswegen könnte E90 zwar an der Kanalöffnung beteiligt, ihr Einfluss auf andere Konformationsänderungen aber geringer sein. Da es zu keiner Verschiebung des Absorptionsmaximums kam, sind direkte Interaktionen mit der Schiffbase im Gegensatz zu E123 unwahrscheinlich (Abb. 3.2.15). Allerdings könnte es elektrostatische Wechselwirkungen mit dem komplexen Gegenion geben, da bei UV/Vis-Messungen die Schiffbase von E90Q schneller deprotonierte als die des Wildtyps [22]. Die Rückkehr in den Grundzustand, deren Kinetik in der Größenordnung der *Recovery* Kinetik lag, war ebenfalls signifikant beschleunigt.

E90D

Im Gegensatz zu E90Q sind die *IV*-Kurven von E90D denen des Wildtyps sehr ähnlich. Zum Beispiel nahm der Einstrom zwischen pH_e 7,5 und pH_e 4 nur wenig zu und es gab keinen Ausstrom bei pH_e 4/ +50 mV (Abb. 3.2.6). Auffällig waren jedoch die verschobenen Umkehrpotentiale unter sauren und basischen Bedingungen, die für eine höhere Kationenselektivität bei E90D sprechen (Abb. 3.2.6-F). Eine mögliche Erklärung für den relativ großen Einstrom bei pH_e 9 in NMG-Cl wäre, dass in Abwesenheit von Natriumionen und bei sehr niedriger Protonenkonzentration, E90D verstärkt bivalente Kationen leitet (Abb. 3.2.6-E). Die Strom/Spannungskurven bei pH_e 9 konnten mit dem *Two Barrier* Modell nicht

reproduziert werden. Der Grund hierfür könnte in der Nichtberücksichtigung von Ca^{2+} und Mg^{2+} als Ladungsträger liegen, für die E90D möglicherweise eine relativ hohe Permeabilität besitzt.

E90H

Durch diese Mutation wurde eine potentiell positiv geladene Aminosäure an Position 90 eingebaut. Dies führte zu einer deutlichen Reduktion des Photostroms unter physiologischen Bedingungen (Abb. 3.2.1). Da zudem der Einstrom in NMG-Cl kaum abnahm, muss die Kationenselektivität bei E90H stark reduziert sein. Folgerichtig nahm der Einstrom bei sinkenden pH_e Werten deutlich zu (Abb. 3.2.8). Deshalb war der Ausstrom, den E90H bei pH_e 4/ +50 mV zeigte, sehr überraschend. Er muss aufgrund des hohen Protonengradienten von Kaliumionen getragen werden. Auch bei pH_e 7,5 und pH_e 6 muss es einen hohen Kaliumausstrom geben, da die Umkehrpotentiale unter diesen Bedingungen, für einen größtenteils durch Protonen getragenen Strom zu negativ waren (Abb. 3.2.9). Zum Beispiel betrug das Umkehrpotential bei Na_e / pH_e 7,5 für Protonen ca. -10 mV, für Natriumionen ca. +72 mV und für Kaliumionen ca. -120 mV. Das gemessene Umkehrpotential lag unter diesen Bedingungen jedoch bei -29 mV und in NMG-Cl, verschob es sich auf -39 mV. Bivalente Kationen scheiden hierfür aus, da sie unter den experimentellen Bedingungen ein positives Umkehrpotential aufweisen. Das bedeutet, dass bei E90H der Einstrom von Protonen und der Ausstrom von Kaliumionen getragen wird.

Die Amplituden von E90H konnten durch das *Two Barrier* Modell nicht reproduziert werden. Mit dem Konzept mehrerer Bindungsstellen ist das Verhalten von E90H aber besser zu verstehen (Abb. 4.2.20). Offensichtlich führte die Einführung eines Histidins zu einer stärkeren Trennung von extrazellulären und intrazellulären Bindungsstellen, durch Ausbildung einer hohen internen Energiebarriere für den Protonentransport. Die extrazellulär gelegenen Bindungsstellen müssen eine hohe Affinität für Protonen aufweisen. Die Transportrate in Richtung des Cytosol sollte aber durch hohe Energiebarrieren verzögert sein. Dadurch werden Protonen nur bei großen negativen Spannungen geleitet. Außerdem wird durch die Protonierung der äußeren Bindungsstellen die Bindung und damit der Transport von extrazellulären Natriumionen geblockt. Die intrazellulären Bindungsstellen können bei positiven Spannungen weitgehend von Kaliumionen besetzt werden, wenn der nach innen gerichtete Transport von Protonen inhibiert ist. Möglicherweise fällt H90 aufgrund eines hohen pK-Wertes als interner Protonenakzeptor aus und hemmt somit den Protonentransport. Falls H90 geladen ist, könnte die positive Ladung durch Wassermoleküle oder benachbarte negative Reste abgeschirmt werden. Außerdem könnte die Position zeitweise deprotoniert vorliegen, wodurch Kaliumionen leichter passieren würden. Inwieweit sich die Mutation auf elektrostatische Wechselwirkungen auswirkt bleibt jedoch spekulativ. Allerdings könnte eine positive Ladung den pK-Wert benachbarter Carboxylgruppen senken und damit auch deren Funktion als Protonenakzeptoren beeinträchtigen.

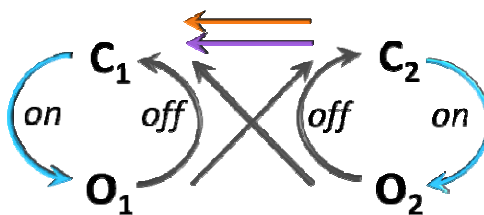


Abb. 4.2.21 Modifiziertes 4-Zustandsmodell von E90H. (vgl. 4.1.6) Im Unterschied zum Wildtyp findet der Übergang von C2 nach C1 nicht durch einen thermischen Übergang statt. Nach einer Anregung mit einem Lichtpuls relaxiert der Kanal daher nicht von C2 nach C1. Die Applikation von Licht mit 570 nm (orange) oder 400 nm (violett) bewirkt aber einen photochemischen Übergang.

Die Wiederherstellung des transienten Stroms gelang nur durch die Applikation von UV- oder rotverschobenen Licht während der Dunkelphase (Abb. 3.2.11). Dies zeigt, dass E90H nicht in der Lage ist, thermisch in den Ausgangszustand zu relaxieren (C1). Es lagen ca. 1-2 s zwischen der Abschaltung des Anregungslichtes und der zweiten Lichtapplikation. Das bedeutet, dass die Photokonversion von einem Intermediat ausgeht, das nach den leitenden Zuständen entsteht. Nach dem 4-Zustandsmodell kommt dafür nur C2 in Frage. Vermutlich ist bei E90H der Übergang $C2 \rightarrow C1$ inhibiert und wird erst durch die Lichtapplikation ausgelöst (Abb. 4.2.21). Der molekulare Zustand von C2 bei E90H muss sich aber grundlegend von ChR2-WT unterscheiden, da dort die *Recovery* Kinetik nicht photochemisch beschleunigt werden konnte. Möglicherweise liegt bei E90H auch eine Mischung aus verschiedenen Intermediaten vor, da sowohl Wellenlängen mit 400 nm als auch mit 570 nm C1 wiederherstellten. Spektroskopische Messungen könnten darüber genaueren Aufschluss geben. Zum Beispiel könnte so festgestellt werden, ob bei E90H der Übergang von einem späten Photozyklusintermediat, zum Beispiel P480_b, zurück in den Grundzustand (D470) inhibiert ist und durch Lichtanregung beschleunigt werden kann (vgl. Abb. 1.6).

E90K

Auch die Einführung von Lysin führte unter physiologischen Bedingungen zu einer sehr deutlichen Reduzierung des Photostroms (Abb. 3.2.1). Wie bei E90H wurde der Einstrom unter diesen Bedingungen zum Großteil von Protonen getragen. Zwischen pH_e 9 und pH_e 4 nahm der Einstrom, und im Gegensatz zu E90H, auch der Ausstrom zu (Abb. 3.2.12). Der Einstrom wurde von Protonen getragen, wohingegen der Ausstrom wahrscheinlich auf Kaliumionen zurückgeht. Dieser nahm bei sinkenden pH_e-Werten stetig zu, obwohl sich nur der Protonengradient änderte. Lysin hat einen höheren pK-Wert als Histidin. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass K90 deprotoniert vorliegt wesentlich geringer. Die Funktion dieser Position als potentieller Transmitter eines Protonenstroms wäre damit stark eingeschränkt. Eine positive Ladung an dieser Stelle könnte auch den Transport von Kaliumionen durch Repulsion reduzieren. Nach dieser Hypothese müssten diese Kräfte bei hohen extrazellulären Protonenkonzentrationen nachlassen, da der Kaliumtransport hier zunimmt. Da aber auch der Protoneneinstrom zunimmt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass K90 protoniert

vorliegt eher an. Bei der Steigerung der Kanalaktivität kann es sich um eine pH_e -abhängige Aktivierung handeln. Falls K90 dauerhaft protoniert ist, könnten die pK -Werte von Glutamat und Aspartatresten in der Umgebung gesenkt werden. Dadurch könnte die Bindung von Protonen und Kationen inhibiert werden, weil die resultierende Abschirmung negativer Ladungen dann thermodynamisch ungünstig wäre. Dass geladene Aminosäuren auch über weitreichende elektrostatische Interaktionen den Protonierungszustand anderer Reste beeinflussen können, wurde bereits von Calimet et al. diskutiert [69]. Unklar bleibt aber weiterhin, warum die Aktivität von E90K bei pH_e 4 plötzlich ansteigt. Der Verlauf der Strom/Spannungskurven in NaCl und NMG-Cl spricht jedenfalls für die Besetzung der äußeren Bindungsstellen durch Protonen. Der Protonierungsgrad von extrazellulär gelegene Aspartat- und Glutamatresten könnte unter sauren Bedingungen sehr hoch sein. Möglicherweise führt dies über einen unbekannten Mechanismus zu einer Absenkung des pK -Wertes von K90, wodurch das Lysin deprotoniert werden könnte. Die Messungen von E90Q, E90A (Abb. 3.2.13) und E90L (Abb. 3.2.14), die ebenfalls einen Ausstrom bei pH_e 4/ +50 mV zeigten, implizierten, dass dies auf eine neutrale Position 90 zurückgeht. Allerdings spricht die Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von E90K bei pH_e 4, für erheblich veränderte, elektrostatische Wechselwirkungen innerhalb des Kanals (Abb. 3.2.15).

E90A

Die Einführung von Alanin führte unter physiologischen Bedingungen nicht zur Reduktion des Photostroms (Abb. 3.2.1). Diese Beobachtung wurde auch von Sugiyama et al. gemacht [48]. Allerdings kam es bei E90A zu einer Abnahme des Einstroms bei pH_e 4 (Abb. 3.2.13). Trotzdem strömten hier bei +50 mV Ladungsträger aus der Zelle heraus. Alanin ist ungeladen und dessen Seitengruppe kann im Gegensatz zu Glutamin keine Wasserstoffbrückenbindung bilden. Folgt man der vorangegangenen Diskussion, könnte dies zu einer höheren Energiebarriere für den Protonentransport und zu einer stärkeren Inhibition führen. Dadurch wären die Besetzungswahrscheinlichkeiten der äußeren Bindungsstellen durch Protonen bei negativen Spannungen sehr hoch, da der nach innen gerichtete Transport sehr schwach ist. Eine höhere Protonenkonzentration im Außenmedium führt zu einer noch höheren Protonendichte an den äußeren Bindungsstellen, wodurch der Einstrom zunehmend blockiert werden würde, da die Besetzungswahrscheinlichkeit für Na^+ sinkt. Eine große Energiebarriere für den Protonentransport könnte dazu führen, dass auch bei einer hohen extrazellulären Protonenkonzentration und bei positiven Spannungen die internen Positionen durch Kaliumionen besetzt werden.

Fazit E90

Die E90 Mutationen sind mechanistisch sicher die interessantesten, da sich ihre Transporteigenschaften grundlegend vom Wildtyp unterscheiden. Die Diskussion über die genauen Ursachen ist aber schwierig, weil die genaue Position von E90 unbekannt ist. Homologiemodelle zeigen die übereinander geordnete Positionierung

der geladenen Reste des Glutamatmotivs in Helix B (Abb. 1.8, [23]). Sie könnten damit ein wichtiges Element der ionenleitenden Pore bilden. Das Glutamatmotiv ist in allen bekannten Channelrhodopsinen konserviert, nicht aber in den mikrobiellen Rhodopsinen, die keine Kanalfunktion aufweisen. Die Sequenzunterschiede zwischen den Proteinen bedingen mit Sicherheit auch deren Funktionsunterschiede. Sugiyama et al. zeigten, dass die ChR2 Mutation E97A zu einer deutlichen Reduktion des Photostroms führte und schrieben dieser Position eine zentrale Rolle bei der Ionentranslokation zu [48]. Für E90 schlossen sie dies indirekt aus, weil die Mutation E90A den Photostrom nicht reduzierte. Allerdings wurde dort nur unter neutralen Bedingungen und in einem relativ schmalen Spannungsbereich gemessen. E90 orientiert sich laut dem Homologiemodell (vgl. Abb. 1.8) mehr in der Mitte des Glutamatmotivs und könnte daher ebenfalls eine zentrale Rolle beim Ionentransport spielen. Meine Messungen zeigten, dass Mutationen an dieser Position zu einer Inhibierung des Protonentransports führten. Dadurch wird auch deutlich, dass bei ChR2 die Ladungsträger über mehrere interne Bindungsstellen geleitet werden müssen. Allerdings stellen beim Wildtyp die Übergänge zwischen ihnen nicht die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte des Transports dar, weil das *Two Barrier* Modell dessen Amplituden relativ gut reproduzieren kann. Weitere Bindungsstellen könnten durch die anderen geladenen Reste des Glutamatmotivs wie E97 oder E83 bereitgestellt werden.

Neben dem Einfluss auf die Ionenleitung spielt E90 vermutlich auch eine aktive Rolle bei den Vorgängen, die zur Öffnung und zum Schließen des Kanals führen, sowie bei der langsamen Rückkehr in den Grundzustand. Möglicherweise interagiert E90 über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem komplexen Gegenion und beeinflusst dadurch die Prozesse, die mit dieser Struktur verknüpft sind.

4.2.6 C128 und D156 steuern die Öffnung und das Schließen des Kanals

C128T

Durch diese Substitution wurde ein Threonin an der Position eingeführt, an der sich in BR T90 befindet. C128 ist somit Teil der ChR2-Retinalbindungstasche und befindet sich in unmittelbarer Nähe des Chromophors (Abb. 1.8). Ursprünglich sollte durch die Mutation festgestellt werden, ob C128 einen Beitrag zu dem gegenüber BR stark blauverschobenen ChR2-Spektrum leistet. Wie später bei UV/Vis-Messungen festgestellt wurde [75], hat C128T tatsächlich ein um 12 nm rotverschobenes Absorptionsmaximum. Das spricht für elektrostatische Interaktionen dieser Position mit dem Retinal.

Die Strom/Spannungskurven und Umkehrpotentiale von C128T waren denen des Wildtyps sehr ähnlich. Daher ist der Einfluss dieser Mutation auf die Ionenselektivität nicht sehr groß. Wesentlich interessanter waren dagegen die Auswirkungen auf die Kanalkinetiken, die gegenüber dem Wildtyp deutlich

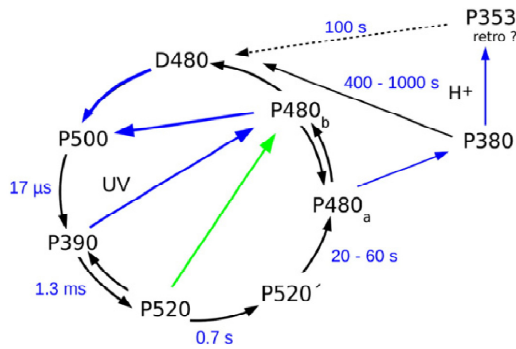


Abb. 4.2.22 Photozyklus von C128T, abgeleitet aus spektroskopischen und elektrophysiologischen Daten. Schwarze Pfeile kennzeichnen thermische und farbige Pfeile photochemische Übergänge. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Zeitkonstanten der Übergänge. Die Aktivierung erfolgt beim Übergang D480→P500. Die Kinetiken der Übergänge vom Grundzustand (D480) in die deprotonierte Spezies (P390) und in den leitenden Zustand (P520) stimmen mit ChR2-WT weitgehend überein. Der Zerfall von P520 war aber ca. 500-mal langsamer und es traten weitere blauverschobene Spezies im photostationären Gleichgewicht auf (P353, P380). Die schnellen Photokonversionen von P520 (grüner Pfeil) und P390 (blauer Pfeil), sind aus den elektrophysiologischen Messungen abgeleitet. (übernommen aus [75])

langsamer verliefen (Abb. 3.7.2). Allerdings gab es dabei einige Unterschiede. Die *on*-Kinetik nach Laseraktivierung war etwa 20-mal langsamer, während die *off*-Kinetik bereits über 100-mal langsamer war. Bei Anregung mit Lichtpulsen zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Die Inaktivierung und *off*-Kinetik waren ebenfalls über 100-mal langsamer im Vergleich zum Wildtyp. Dagegen war die *Recovery* Kinetik mit einer gerade 3-fachen Verlangsamung noch vergleichsweise schnell. Insgesamt scheint bei C128T vor allem der Zerfall der leitenden Zustände beeinträchtigt zu sein. Dies konnte von Katja Stehfest durch Messungen im UV/Vis-Bereich bestätigt werden. Nach Blitzlichtaktivierung verlief die Entstehung der deprotonierten Spezies (P390) und des leitenden Intermediats (P520) ähnlich schnell wie bei ChR2-WT (Abb. 4.2.22) [75]. Daher scheinen die Geschwindigkeit der Deprotonierung und Reprotonierung der Schiffbase bei C128T nicht beeinträchtigt zu sein. Allerdings war bei den elektrophysiologischen Messungen die Entstehung des leitenden Zustands nach Laseranregung etwa 20-mal langsamer ($\tau_{\text{on}} = 5,5 \text{ ms}$) als bei den spektroskopischen Messungen ($\tau_{\text{on}} = 1,3 \text{ ms}$). Hierfür könnten die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen verantwortlich sein, wie die unterschiedlichen pH-Werte und fehlende elektrochemische Gradienten bei den spektroskopischen Messungen. Der Zerfall von P520 ($\tau_{\text{off}} = 60 \text{ s}$) und die *off*-Kinetik der Stromspuren ($\tau_{\text{off}} = 1,4 \text{ s}$) lagen nach Blitzlichtanregung ebenfalls auseinander. Allerdings ist gerade die *off*-Kinetik von der Membranspannung abhängig und führt bei hohen negativen Werten zur Beschleunigung des Schließvorgangs. Dagegen lag bei den spektroskopischen Messungen kein elektrisches Feld an, was möglicherweise zu einer deutlichen Verzögerung führte. Eine weitere Erklärung wäre, dass P520 schnell in ein weiteres Intermediat (P520') übergeht, das nicht leitet und dessen Zerfall daher nur spektroskopisch beobachtet werden konnte (Abb. 4.2.22) [59]. Die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen können ebenfalls zu den Differenzen geführt haben. So war

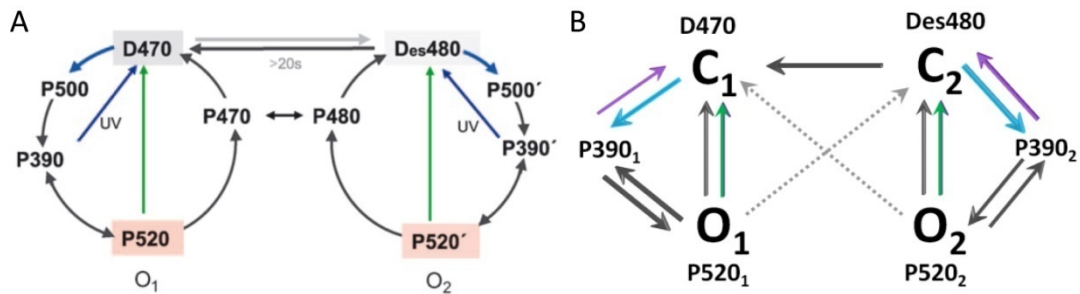


Abb. 4.2.23 Modelle zur Verknüpfung spektroskopischer und elektrophysiologischer Daten. Graue Pfeile kennzeichnen thermische und farbige Pfeile photochemische Übergänge. **A** Hier wurden die spektroskopischen Daten auf das 4-Zustandsmodell übertragen (vgl. Abb. 4.1.6). Die Intermediate D470, P500, P390, P520 und Des480 konnten spektroskopisch identifiziert werden. Der Grundzustand D470 wird durch Blaulicht aktiviert. Des480 wird in den älteren Modellen mit P480 bezeichnet (vgl. Abb. 1.6). Über dieses Intermediat verläuft die langsame, thermische Relaxation nach D470. Des480 muss aus kinetischer Sicht aktivierbar sein. Die resultierenden Intermediate (P500', P390', P520') unterscheiden sich aber spektroskopisch vermutlich nicht von denen des ersten Zyklus und können deshalb nicht eindeutig identifiziert werden (entnommen aus [59]). **B** Das 4-Zustandsmodell wurde um die schnellen Photokonversionen, die die leitenden Zustände entvölkern, erweitert (grüne und violette Pfeile). Die blauen Pfeile stellen die Aktivierung der nicht leitenden Zustände dar (C1, C2). O1 und O2 müssen mit den deprotonierten Spezies (P390) in Gleichgewicht stehen.

beispielweise der P520 Zerfall von in Vesikeln rekonstituierten ChR2 mit 20 s signifikant schneller gegenüber den Messungen in Dodecylmaltosid [75].

Aus den elektrophysiologischen Messungen ging hervor, dass die Bestrahlung des leitenden Zustands mit, gegenüber der Anregungswellenlänge blau- (< 405 nm) und rotverschoben Licht (> 530 nm) zu einer Beschleunigung des Schließvorganges führt (Abb. 3.7.4). Bei einer sofortigen, erneuten Anregung mit 450 nm, konnte der transiente Strom (I_P) aber nicht wiederhergestellt werden (Abb. 3.7.6). Da aus den spektroskopischen Messungen hervorging, dass P390 mit P520 im Gleichgewicht steht, wurde vorgeschlagen, dass P390 durch UV Licht entvölkert wird und damit die P520 Population indirekt verringert wird. Rotverschobenes Licht führte dagegen direkt zur Photokonversion von P520. Anfangs wurde vermutet, dass die Einstrahlung von zusätzlichem Licht während der *off*-Phase nicht zur direkten Umwandlung der Photointermediate in den Grundzustand führt (Abb. 4.2.22), da die *Recovery* Kinetik dadurch nicht beschleunigt wurde. Man kann aber davon ausgehen, dass im Gleichgewicht sowohl O1 als auch O2 photochemisch umgewandelt werden. Unter dieser Voraussetzung können die Lichtreaktionen direkt nach C1 und C2 führen. Denn dadurch wird das Gleichgewicht zwischen O1 und O2 nicht verändert (Abb. 4.2.23) [59]. Bei einer sofortigen, erneuten Anregung werden C1 und C2 aktiviert und die resultierenden Photoströme entsprechen der Gleichgewichtsaktivität.

Im photostationären Gleichgewicht sah man im UV/Vis-Spektrum von C128T feinstrukturierte Banden im nahen ultravioletten Bereich [75]. Sie wurden einem Intermediat mit deprotonierter Schiffbase zugeordnet (P353). Diese Banden können auf die Existenz eines sogenannten *retro*-Retinals hinweisen, bei dem die Doppelbindungen um eine Position verschoben sind [76]. Beim Wildtyp konnte deren Entstehung aber nicht beobachtet werden. Das könnte heißen, dass diese

Intermediate dort nicht existieren oder nur eine sehr kurze Lebenszeit besitzen. Allerdings gibt es durch Messungen mit Ramanspektroskopie Hinweise darauf, dass sich bei diesen C128T-Intermediaten die kovalente Bindung zwischen Retinal und K257 gelöst hat (Sara Bruun, unpubliziert). Möglicherweise führte die Mutation zu einer Destabilisierung des Chromophors im Photozyklus von C128T.

Nach Lichtapplikation kehrte ChR2 mit einem τ -Wert von ~ 100 s in den Grundzustand D470 zurück. Diese Reaktion war aber nicht vollständig und auch nach 10 min blieb eine Spezies mit einer extrem langsamen Zerfallskinetik zurück ($\tau > 10$ min), die P380 genannt wurde [75]. Des Weiteren konnte bei C128T der Anteil der blauverschobenen Banden im UV/Vis-Spektrum durch die Zugabe von 30 mM Natriumazid erhöht werden. Dadurch wurde auch der Zerfall von P520 beschleunigt. Vermutlich gehen P353 und P380 nicht direkt aus P520 hervor, da diese Intermediate nicht nach einer Blitzlichtaktivierung beobachtet werden konnten. Die Geschwindigkeit der Entstehung der gelben Intermediate korreliert nicht mit dem Zerfall des leitenden Zustands P520. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass sie aus einem Intermediat, das nach P520 kommt hervorgehen. Hierfür kommt zum Beispiel P480_a in Frage. Allerdings konnte ich bei den elektrophysiologischen Messungen keine Änderung bei den Kanalkinetiken und Stromamplituden in Anwesenheit von Natriumazid feststellen. Daher bleibt zunächst unklar ob P353 und P380 hier entstanden oder ob dies eine Eigenschaft der spektroskopischen Messungen war.

Durch die langsamen Kinetiken ist C128T von großem Interesse für zeitaufgelöste Spektroskopie, weil damit Prozesse beobachtet werden können, die beim Wildtyp zu schnell ablaufen. So konnte durch FTIR Messungen gezeigt werden, dass die ungewöhnlich großen Konformationsänderungen von ChR2 bereits bei der Entstehung von P390 stattfinden [77]. Das könnte bedeuten, dass diese Konformationsänderungen nicht direkt die Kanalöffnung abbilden, sondern ihr nur vorrausgehen oder dass bereits P390 ein leitendes Intermediat ist. Erwartungsgemäß laufen auch die Konformationsänderungen von C128T verlangsamt ab. Dagegen ist die initiale Retinalisomerisierung bei C128T nicht gestört.

C128A

Gegenüber C128T kam es bei dieser Mutante zu einer weiteren Verlangsamung der Kanalkinetiken. Dies betraf insbesondere das Schließen des Kanals (Abb. 3.7.7). Dagegen war nach Laserblitzanregung die *on*-Kinetik etwa so schnell wie die von C128T. Daraus kann man folgern, dass die Prozesse die zur Kanalöffnung führen durch die Alaninmutation nicht weiter beeinträchtigt wurden. Wie bei C128T konnte das Schließen des Kanals photochemisch beschleunigt werden. Vermutlich überlappen sich aber die Absorptionsmaxima des Grundzustands und der leitenden Zustände. Dadurch führte die Einstrahlung von Licht während der *off*-Phase zur erneuten Aktivierung, wenn die gewählte Wellenlänge relativ nahe bei 470 nm lag. Deshalb war die photochemische Beschleunigung der *off*-Kinetik nicht vollständig (Abb. 3.7.8). Auf der anderen Seite werden während der Anregung auch Kanäle

deaktiviert, wodurch die mit der *off*-Kinetik verknüpfte Lichtsensitivität abnahm. Die Geschwindigkeit der lichtinduzierten Kanalschließung ist dagegen ein Indiz für die optischen Eigenschaften der leitenden Zustände. Je schneller sie verlief, umso näher lag die gewählte Wellenlänge an deren Absorptionsmaxima. Bei C128A wurde die höchste Beschleunigung mit 510 nm erreicht.

Bei den Messungen mit C128A fiel auf, dass nach wiederholter Anregung die Kanalaktivität abnahm. Schoenenberger et al. konnten diesen Effekt bei Messungen an Neuronen ebenfalls nachweisen [39]. Die vollständige Wiederherstellung der transienten Stromamplituden dunkeladaptierter Zellen gelang dort erst nach einer Pause von einem Tag. Dabei war nicht klar, ob dies eventuell auf die Proteinsynthese neuer und damit dunkeladaptierter Kanäle zurückging. Sie vermuteten, dass die Kanäle nach anhaltender Anregung in einen nichtaktiven, sogenannten *lost state* übergingen. Der Übergang in diesen Zustand konnte aber verhindert werden, wenn das Schließen der Pore durch grünes Licht beschleunigt wurde. *Voltage Clamp* Messungen an Oocyten zeigten, dass die Inaktivierung von C128A erst nach einer anhaltenden Belichtung von 30 min vollständig abgeschlossen war (Abb. 3.7.7). Dieser Übergang fand auch bei wiederholter Anregung mit kurzen Lichtpulsen statt (Abb. 3.7.8). Der *Recovery* Prozess, der in den Grundzustand führt, muss noch wesentlich langsamer sein und konnte nicht gemessen werden. Dadurch nahm die Aktivität des Kanals stetig und dauerhaft ab. Der *lost state* könnte daher der zweite Zyklus des 4-Zustandsmodells mit dem schwach leitenden Zustand O2 sein (Abb. 4.1.6). Dessen Absorptionsmaximum liegt wahrscheinlich bei ca. 500 nm, da die schnelle, photochemische Kanalschließung mit grünem Licht auch im Gleichgewicht funktionierte. Daher ist es unwahrscheinlich, dass bei C128A ein Seitenzyklus über ein Intermediat wie P353 oder P380 den *lost state* darstellt. Die Inaktivierung konnte verzögert werden, wenn der Kanal nach Anregung sofort mit grünem Licht geschlossen wurde (Abb. 3.7.8-C). Damit bestätigt sich die Vermutung, dass die schnelle Photokonversion des leitenden Zustands den Photozyklus abkürzt und den Übertritt in den zweiten Zyklus verhindert. Falls der Übertritt in den zweiten Zyklus nicht direkt von O1 erfolgt, sondern von einem weiteren Zwischenintermediat ausgeht, so wird dieses übersprungen (Abb. 4.2.23-A).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Baman et al., die ein analoges Experiment mit ChR2-WT durchgeführt haben [24]. Dort wurden bei einer kontinuierlichen Anregung mit blauem Licht gleichzeitig grüne Laserpulse während der Inaktivierungshase appliziert. Dadurch nahm die Aktivität zunächst ab. Bei der Reaktivierung des Kanals lagen die Stromamplituden aber über dem Ausgangsniveau. Vermutlich wurden durch die grünen Laserpulse mehr Moleküle im ersten Zyklus des 4-Zustandsmodells gehalten. Dieses Experiment spricht dafür, dass auch bei ChR2-WT der Übergang in den zweiten Zyklus durch rotverschobenes Licht verhindert wird. Wie bei C128A kürzt die schnelle Photokonversion den Photozyklus ab, wobei einige Intermediate übersprungen werden. Folglich muss aus einem dieser Intermediate oder direkt aus O1 (P520) der Übergang in den zweiten Zyklus erfolgen. Wie bei C128T bereits diskutiert wurde,

kann die Photokonversion der leitenden Zustände (O1, O2) direkt nach C1 und C2 erfolgen (Abb.4.2.23-B).

C128S

Bei C128S kam es zu einer weiteren Verzögerung der *off*-Kinetik, die von allen C128 Einzelmутanten am langsamsten war (Abb. 3.7.9). Ihr τ -Wert war etwa 9000-mal größer als der von ChR2-WT. Die *off*-Kinetik konnte zwar nicht nach einer Laserblitzaktivierung gemessen werden, aber dort zeigte sich, dass die *on*-Kinetik im Vergleich zu den beiden anderen C128 Mutanten deutlich verzögert ablief. Das weist auf eine erhebliche Verlangsamung der Prozesse hin, die zur Kanalöffnung führen. Nach der Laseranregung gab es unter neutralen Bedingungen und negativen Spannungen einen transienten Nettoausstrom, der nur langsam in den erwarteten Einstrom überging. Möglicherweise handelt es sich hier um eine interne Ladungsverschiebung, die der Kanalöffnung vorrausgeht und beim Wildtyp aufgrund einer höheren Geschwindigkeit nicht beobachtet werden kann. Dabei könnte es sich zum Beispiel um die Deprotonierung der Schiffbase handeln, die ihr Proton in Richtung Cytosol abgibt.

Die langsame Inaktivierung dunkeladaptierter Proben konnte ich bei C128S nicht messen. Allerdings habe ich auch hier eine stetige Abnahme der Kanalaktivität nach mehrfacher Anregung beobachtet. Schoenenberger et al. konnten dies durch Messungen in Neuronen bestätigen [39]. Daher kann man bei C128S ebenfalls von einem extrem langsamen Übergang in den zweiten Zyklus des 4-Zustandsmodells ausgehen. Wahrscheinlich war bei C128S auch die *Recovery* Kinetik weiter verzögert, die in der Größenordnung von Stunden liegen könnte. Die *off*-Kinetik von C128S konnte durch Applikation von gegenüber der Anregungswellenlänge rotverschobenem Licht beschleunigt werden (Abb. 3.7.10). Daher werden die leitenden Zustände von C128S ebenfalls durch schnelle Photokonversionen in nichtleitende Intermediate umgewandelt. Allerdings konnte ich bei C128S nach dem Ende Lichtapplikation eine transiente Zunahme der Stromamplitude beobachten (I_{2p}) (Abb.3.7.11). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine transiente Zunahme des leitenden Zustands. Leider reichen die bisherigen Zustandsmodelle nicht aus um diesen Effekt zu simulieren. Grundsätzlich muss es bei C128S durch Photokonversionen zu einer indirekten Verarmung der Population der leitenden Zustände kommen. Nach der Lichtapplikation stoppen diese photochemischen Reaktionen. Die Population der leitenden Zustände steigt kurzzeitig, weil die Kanäle über sie zurück in den Grundzustand relaxieren. Nach dem erweiterten Modell in Abb. 4.2.23-B können die Photokonversionen der leitenden Zustände (O1, O2) und von P390 tatsächlich zur Verringerung der Population der leitenden Zustände im Gleichgewicht beitragen. Allerdings kann mit diesem Modell keine transiente Aktivitätszunahme nach dem Ende der Lichtapplikation modelliert werden. Die Photokonversionen führen zurück nach C1 und C2, die ohne Licht nicht mehr aktiviert werden. Die Moleküle in P390 relaxieren zwar über die leitenden Zustände zurück in den Grundzustand, aber

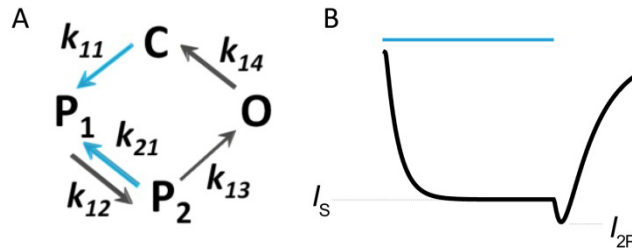


Abb. 4.2.24 Hypothetisches Zustandsmodell von C128S zur Erklärung der transienten Zunahme der Kanalaktivität nach Lichtabschaltung. **A** Nach den Photoströmen von C128S ist der Kanal im Gleichgewicht fast vollständig in den zweiten Zyklus des 4-Zustandsmodells übergegangen, daher wurde der erste Zyklus vernachlässigt und von einem zyklischen Photozyklus zur Erklärung von I_{2P} ausgegangen. Der nichtleitende Zustand C wird durch Licht aktiviert (blauer Pfeil) und geht in ein nicht leitendes Intermediat (P₁) über. Während der Anregung steht P₁ mit einem weiteren Intermediat im Gleichgewicht (P₂), wobei die Rückreaktion (k_{21}) nur photochemisch erfolgt. Das wirkt sich indirekt auf die Population des Offenzustands O aus. Sie wird im Gleichgewicht kleiner, weil ein Teil der Moleküle in P₁ und P₂ verbleiben. Erst wenn nach den Ende der Lichtapplikation $k_{21} = 0$ wird, nimmt die Population von O kurzzeitig zu. Die schnelle Photokonversion des leitenden Zustands wurde hier vernachlässigt. Sie könnte aber sowohl nach C oder ebenfalls nach P₁ führen. **B** Die mit dem Modell simulierte Stromspur zeigt, dass nach Ende der Lichtaktivierung (blauer Balken) die Aktivität kurzzeitig zunimmt (I_{2P}). Die Geschwindigkeitskonstanten wurden ohne Einheit angegeben. Da durch die Vernachlässigung der Photokonversion des leitenden Zustands (O) dieses Modell nur qualitativen Charakter hat.

deren Population nimmt dadurch nicht zu. Dafür müsste die Photokonversion in ein Intermediat des Zyklus führen, das nach Ende der Lichtapplikation thermisch in die leitenden Zustände übergehen kann. Um diesen Effekt zu simulieren habe ich einen einfachen Photozyklus modelliert (Abb. 4.2.24). Die Photoströme von C128S zeigten nach wiederholter Anregung keinen transienten Strom (I_P) mehr. Außerdem dominierte der Anteil der langsamen Komponenten (A_2) bei der *off*-Kinetik (Tab. 3.8.23). Vermutlich sind die Übergänge vom zweiten in den ersten Zyklus des 4-Zustandsmodells extrem langsam und ein Großteil der lichtadaptierten Moleküle verblieb im zweiten Zyklus. Trotzdem trat der zweite transiente Strom (I_{2P}) weiterhin auf. Für die qualitative Diskussion der C128S Photoströme bin ich deshalb von einem zyklischen Modell ausgegangen. Es umfasst einen nichtleitenden geschlossenen Zustand C, in den der Kanal nach der Lichtapplikation relaxiert und einen offenen Zustand O. Nach den Experimenten zur photochemischen Beschleunigung der *off*-Kinetik, kann er durch eine schnelle Photokonversion umgewandelt werden. Diese Reaktion ist für die Entstehung von I_{2P} aber nicht entscheidend. Deshalb habe ich sie zur Vereinfachung vernachlässigt. Des Weiteren befinden sich vor O die nicht leitenden Intermediate P₁ und P₂ (Abb. 4.2.24). Nach der Aktivierung von C entsteht P₁, das thermisch in P₂ umgewandelt wird und von dem aus O bevölkert wird. Während des Zyklus muss es eine Photokonversion geben, die zu einer Verringerung der Moleküle in O führt. Diese Umwandlung kann nicht direkt nach C führen, da die Population von O nach Ende der Lichtapplikation sonst nicht zunehmen würde. Stattdessen muss das Produkt ein Intermediat sein, das thermisch in den leitenden Zustand übergehen kann. Daher führt die entscheidende Photokonversion von P₂ zurück nach P₁. Während der Lichtapplikation befinden sich beide Spezies miteinander im Gleichgewicht. Diese

Reaktion wird durch die Lichtabschaltung beendet und es kommt zu einer transienten Zunahme von O. Für die zusätzliche Photokonversion spricht die Wellenlängenabhängigkeit von I_{2P} . Bei pH_e 9/ -75 mV erreichte I_{2P} nach Anregung mit 400 nm nur 1/3 des Wertes gegenüber Anregungen mit 450 nm und 500 nm. Offensichtlich war die photochemische Umwandlung von P2 nach P1 bei diesen Wellenlängen effizienter. Damit scheint es unwahrscheinlich, dass P2 eine deprotonierte Spezies ist, da deren Absorptionsmaximum weiter blauverschoben sein muss. Um dies zu verifizieren, müssen aber noch weitere, insbesondere spektroskopische Messungen gemacht werden. Die relative Abnahme von I_{P2} unter sauren Bedingungen könnte dagegen auf eine verkürzte Lebenszeit von P2 unter sauren Bedingungen zurückgehen.

D156

Dieses Aspartat befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu C128, deren Seitengruppen wahrscheinlich über eine Wasserstoffbrückenbindung verknüpft sind (Abb. 1.8) [57]. Um zu testen, ob eine gestörte Interaktion zwischen diesen Positionen die Verlangsamung der Kanalkinetik verursacht, habe ich D156 gegen Alanin und Asparagin ausgetauscht.

D156A war in meinen Experimenten nur sehr schwer zu charakterisieren. Trotz mehrfacher Wiederholung der Mutagenese waren die Membranströme oft sehr instabil. In den wenigen stabilen Messungen reichte ein kurzer Anregungspuls, um den Kanal dauerhaft zu öffnen (Abb. 3.7.13). Die Stromamplituden waren aber vergleichsweise klein. Anders als bei den C128 Mutanten korrelierte die Lebenszeit der leitenden Zustände nicht mit der Kanalaktivität. Der Kanal ließ sich erst durch sehr rotverschobenes Licht (629 nm) nach minutenlanger Anregung teilweise schließen. Diese Messungen widersprechen denen von Baman et al. [58], wo D156A nach Anregung eine langsame aber deutliche, biexponentielle *off*-Kinetik zeigte. Dort verlief auch die lichtinduzierte *off*-Kinetik wesentlich effizienter und der Kanal konnte durch Applikation von 593 nm mit einem τ -Wert von 480 ms geschlossen werden. Warum die D156A Messungen in der vorliegenden Studie derart instabil waren, ist bisher nicht klar, aber es steht fest, dass Mutationen an D156 prinzipiell die gleichen Effekte hervorrufen wie die an C128.

Da dies vermutlich auf eine gestörte Interaktion der nativen Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Seitengruppen von C128 und D156 zurückgeht, habe ich D156 gegen Asparagin mutiert. Die Seitengruppe dieser Aminosäure ist im Gegensatz zu Alanin in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden. Die Kanalkinetiken von D156N waren gegenüber D156A signifikant schneller und denen von C128T sehr ähnlich. Falls die Verlangsamung der Kanalkinetik tatsächlich mit Interaktionen zwischen den Positionen 156 und 128 zusammenhängt, so war die Störung bei D156N weniger schwerwiegend als bei D156A.

Fazit C128 und D156A

Wahrscheinlich führten gestörte Wechselwirkungen zwischen C128 und D156 zur Verzögerungen bei der Öffnung und beim Schließen des Kanals, da Mutationen an beiden Positionen ähnliche Effekte hervorriefen. Aus den Röntgenstrukturen von BR geht hervor, dass die Seitengruppen der homologen Reste BR-T90 und BR-D115 durch eine Wasserstoffbrückenbindung interagieren. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Mutationen an BR-D115 keine nennenswerten Störungen des Photozyklus verursachten.

Nack et al. konnten durch FTIR Messungen die Wasserstoffbrückenbindung zwischen D156 und C128 bei ChR2 nachweisen. Sie vermuteten, dass dies ein molekularer Schalter ist, durch den die Porenöffnung kontrolliert wird [57]. Durch FTIR Studien konnte auch gezeigt werden, dass Mutationen an C128 und D156 die Wasserstoffbrückenbindung zwischen diesen Resten schwächt. Möglicherweise werden durch sterische oder elektrostatische Wechselwirkungen von C128 mit dem Retinal, Änderungen der Chromophorkonfiguration oder –polarisation detektiert. Diese könnten über die Interaktion von C128 mit D156 an das Opsin weitergegeben werden, wodurch Konformationsänderungen induziert werden.

Allerdings ist bisher nicht klar warum C128T und C128A eine schnellere Kanalkinetik hatten als C128S. Strukturell ist die Seitengruppe von Serin der von Cystein ähnlicher als der von Threonin, die eine zusätzliche Methygruppe aufweist. Des Weiteren ist Alanin nicht in der Lage eine Wasserstoffbrückenbindung zu D156 zu bilden. Prinzipiell kann dadurch die langsame Kinetik von C128A erklärt werden, aber weshalb die Öffnung und das Schließen von C128S noch wesentlicher langsamer abliefen, bleibt unklar.

Bei den C128 Mutanten korreliert die *off*-Kinetik sowohl mit der Lichtsensitivität als auch mit der Größe der Stromamplituden bei der Anregung mit Lichtpulsen (Abb. 3.7.1). Beide Effekte gehen vermutlich auf eine verlängerte Lebenszeit der leitenden Spezies zurück. Je länger diese andauert, umso langsamer verläuft die *off*-Kinetik. Auch wenn bei niedrigen Lichtintensitäten nur sehr wenige Moleküle angeregt werden, bleiben diese lange aktiv. Dadurch können bei anhaltender Belichtung, nach und nach mehr Moleküle in die leitenden Zustände versetzt werden, die dann im Laufe der Zeit akkumuliert werden. Wegen der langsamen Aktivierungsraten bei niedrigen Intensitäten, nimmt die Dauer bis zu Erreichen des Maximalwertes allerdings zu. Dagegen hatte D156N von allen SFO Varianten den größten Photostrom, obwohl die *off*-Kinetik der von C128S entsprach. Bei Anregungen mit Laserpulsen habe ich festgestellt, dass die Stromamplitude von D156N ebenfalls weit über denen der C128 Mutanten lag. Im Gegensatz zu Anregungen mit Lichtpulsen korreliert die Kanalaktivität bei Laseranregung nicht mit der *off*-Kinetik, da die leitenden Zustände nicht in einem Gleichgewichtszustand akkumuliert werden. Stattdessen hängt die vom Expressionslevel und von der Quantenausbeute des Retinals. Daher könnten bei D156N entweder höhere Expressionslevel vorliegen oder die Quantenausbeute der C128 Mutanten könnte reduziert sein.

4.2.7 Zusammenhang zwischen dem Photozyklus und dem 4-Zustandsmodell

Wegen der schnellen Photokonversionen der leitenden Zustände musste das 4-Zustandsmodell, das ich zur Modellierung der Stromspuren verwendet habe, erweitert werden (Abb. 4.2.23-B). Dabei habe ich es nur um die Übergänge erweitert, die nötig sind, um die elektrophysiologischen Daten zu erklären. In Stehfest et al. wurde dagegen versucht, alle aus FTIR und UV/Vis-Messungen gewonnenen Resultate in einen Photozyklus mit zwei parallelen Zyklen zu übertragen. (Abb. 4.2.23-A) [59]. Dass der Kanal bei einer anhaltenden Belichtung in einen zweiten Zyklus übergeht, ergibt sich aus der Modellierung der Photoströme, aber nicht direkt aus den spektroskopischen Messungen. Dort wurde beobachtet, dass der Kanal über ein spätes, langlebiges Intermediat zurück in den Grundzustand läuft (P480_b) (vgl. Abb. 1.6) [22]. Der langsame Zerfall von P480_b könnte die *Recovery* Kinetik von ChR2 darstellen. Deswegen muss dieses Intermediat aktivierbar sein, da sonst die elektrophysiologische Aktivität des Kanals bei anhaltender Belichtung gegen null gehen würde. Daher ist es naheliegend, dass P480_b und C2 aus dem parallelen Photozyklus äquivalente Spezies sind. In dem neueren Modell in Abb. 4.2.23-A wurde P480_b in Des470 umbenannt. Nach der Anregung dieser Spezies finden höchstwahrscheinlich ähnliche Prozesse statt wie im ersten Photozyklus. Daher sind die resultierenden Intermediate, wie zum Beispiel P390⁺ mit einer deprotonierter Schiffbase und der zweite leitenden Zustand P520⁺ spektroskopisch denen des ersten Zyklus vermutlich sehr ähnlich. Die schnellen Photokonversionen der leitenden Zustände führen direkt zurück nach C1 und C2, was den elektrophysiologischen Messungen nicht widerspricht. Im 4-Zustandsmodell führen die langsameren, thermischen Übergänge ebenfalls direkt nach C1 und C2 (Abb. 4.2.23-B). Dagegen verlaufen im spektroskopischen Modell (Abb. 4.2.23-A) die thermischen Rückreaktionen in beiden Zyklen über weitere Intermediate (P470, P480), die miteinander im Gleichgewicht stehen und damit den Übergang in den zweiten Zyklus ermöglichen. Spektroskopisch kann dies damit begründet werden, dass Zerfall von P520 zwar mit der *off*-Kinetik korreliert, aber diese Reaktion nicht direkt in den Grundzustand D470 führt. Es gibt bisher keinen Hinweis darauf, dass von P520 (O1) aus zwei Übergänge stattfinden, wie das 4-Zustandsmodell impliziert. Nach den spektroskopischen Messungen gehen die Kanäle bevorzugt in den zweiten Zyklus über und auch nach dem 4-Zustandsmodell ist der Anteil von O2 im Gleichgewicht höher als der von O1 (Abb. 4.1.7). Bei den spektroskopischen Messungen konnte allerdings noch kein Übergang identifiziert werden, dessen Geschwindigkeit der Inaktivierung der Stromspuren entspricht (τ_{in}) und damit die Übergänge zwischen den beiden Zyklen adäquat beschreibt. Das könnte auch an den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen liegen. Spektroskopische Messungen von rekonstituierten Kanälen in Membranvesikeln, wie sie von Egloff Ritter bereits mit C128T durchgeführt wurden [59], geben die nativen Prozesse wahrscheinlich besser wieder als Messungen in Detergenzien. Außerdem bezieht sich die Modellierung der Stromspuren auf Daten, die bei -100 mV aufgenommen wurden. Bei den spektroskopischen Messungen könnte das fehlende elektrische Feld zu

langsameren Kinetiken und zu einem veränderten Gleichgewicht zwischen den zwei Zyklen führen.

4.2.8 Ionentransport und Aktivierung in ChR2 und die Rolle einzelner Aminosäuren

Bei ChR2 muss der Transport der Ladungsträger passiv über eine wassergefüllte Pore stattfinden. Außerdem muss die Ionenpore von der Membrandomäne gebildet werden, die strukturell BR ähnelt. Im Gegensatz dazu findet bei BR ein vektorieller Protonentransport statt, bei dem ein Proton pro absorbiertem Photon gepumpt wird. Dazu passen die verhältnismäßig großen Konformationsänderungen die ChR2 im Gegensatz zu BR nach Anregung eingeht [22]. Bisher war aber nicht klar, ob die Ionen durch ein Monomer fließen oder über eine Pore, die unter Beteiligung mehrerer Monomere geformt wird. Diese Frage ist noch nicht abschließend beantwortet. Jedoch konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Aminosäuren, die in BR Teil der protonenleitenden Kette sind, bei ChR2 einen erheblichen Einfluss auf die Permeabilität von Ladungsträgern haben. Diese Kette führt genau durch das Protein und könnte bei ChR2 einen Teil der ionenleitenden Pore bilden. Ein entscheidender Faktor beim Ionentransport ist die Konkurrenz um die Bindungsstelle. Nur unter der Voraussetzung, dass der Kanal eine hohe Affinität gegenüber Protonen hat und diese im Vergleich zu monovalenten Kationen sehr langsam transportiert werden, lassen sich die *IV*-Kurven simulieren. Das hier verwendete *Two Barrier* Modell berücksichtigt nur eine Bindungsstelle, obwohl die Messungen an den E90 Mutanten gezeigt haben, dass es mehrere Positionen geben muss, an denen Ladungsträger binden. Dennoch konnte mit dem *Two Barrier* Modell die Daten des Wildtyps und von einem Großteil der Mutanten wiedergegeben werden.

Die hier vorgestellten Daten weisen darauf hin, dass Protonen und Kationen über H134 zu den Ionenbindungsstellen geleitet werden (vgl. Abb. 1.8). Eine extrazelluläre Bindungsstelle könnte dagegen durch E235 bereitgestellt werden. Die Messungen mit den E90 Mutanten zeigten, dass Protonen höchstwahrscheinlich über diese Position durch den Kanal fließen. Die Rolle von E123 und D253 beim Ionentransport ist noch nicht abschließend aufgeklärt, aber auch hier gibt es experimentelle Hinweise, dass diese Reste den Ionentransport beeinflussen. So erhöhte sich zum Beispiel die Protonenpermeabilität des Kanals wenn sich an Position 123 keine negativ geladene Aminosäure befand.

Mutationen an E123 hatten einen erheblichen Einfluss auf alle Übergänge zwischen den Kanalzuständen. Worin die molekularen Ursachen dieses Einfluss liegen ist bislang jedoch unklar. Auch wenn die Schiffbase von ChR2 wie die von BR deprotoniert und anschließend reprotoniert wird, scheint der Aktivierungsmechanismus bei ChR2 anders zu verlaufen. Beispielsweise ist durch die Mutationsstudien zweifelhaft, ob E123 der Protonenakzeptor und H134 der Protonendonator der Schiffbase ist. Möglicherweise beschränkt sich die Rolle von

E123 auf die Stabilisierung des Grundzustands, um möglichst blauverschobene Anregungswellenlängen zu generieren.

Die Reste C128 und D156 sind dagegen essentielle Bestandteile der Kanalakтивierung. Aus FTIR Studien ging hervor, dass ihre Seitengruppen über eine Wasserstoffbrückenbindung verknüpft sind [57]. Möglicherweise ist diese Verbindung ein Transmitter über den Veränderungen des Chromophors an die Proteinumgebung vermittelt werden und somit die Porenöffnung kontrolliert wird.

4.2.9 Tabellarische Zusammenfassung der Modellparameter

Two Barrier Modell

Tab. 4.3 Geschwindigkeitskonstanten für den Transport von Kationen und Protonen nach dem Two Barrier Modell. (vgl. Abb. 4.1.1) (*Berechnung erfolgte nur mit Daten von pH_e 9; 7,5 und 6, †Berechnung erfolgte nur mit Daten von pH_e 4)

	$k_{IH}^0 [s^{-1}]$	$k_{-IH}^0 [s^{-1}]$	$k_{-2H}^0 [s^{-1}]$	$k_{IM}^0 [s^{-1}]$	$k_{-IM}^0 [s^{-1}]$	$k_{-2M}^0 [s^{-1}]$
WT	$4,6 \cdot 10^{11}$	$2,6 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^{11}$	$2,8 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^5$	$7,4 \cdot 10^8$
H134R	$2,0 \cdot 10^{11}$	$1,5 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$
H134D	$4,2 \cdot 10^{10}$	$1,9 \cdot 10^4$	$6,2 \cdot 10^{10}$	$6,5 \cdot 10^4$	$7,4 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$
H134N	$1,3 \cdot 10^{11}$	$9,5 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^{11}$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$
H134S	$1,5 \cdot 10^{11}$	$6,1 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^{11}$	$3,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^8$
E123Q	$4,4 \cdot 10^{10}$	$6,8 \cdot 10^4$	$8,1 \cdot 10^{10}$	$4,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^7$	$4,1 \cdot 10^6$
E123D	$2,4 \cdot 10^{12}$	$7,9 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^{10}$	$4,6 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$
E123T	$1,6 \cdot 10^{11}$	$4,1 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^{11}$	$1,4 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^9$
E123A	$3,5 \cdot 10^{11}$	$5,0 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^{11}$	$5,5 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^7$
D253N	$4,8 \cdot 10^{10}$	$7,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^5$	$7,7 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$
E235Q	$4,4 \cdot 10^{10}$	$1,0 \cdot 10^5$	$6,1 \cdot 10^{10}$	$4,2 \cdot 10^4$	$6,3 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^7$
E90Q*	$6,9 \cdot 10^{12}$	$5,5 \cdot 10^4$	$5,9 \cdot 10^{12}$	$8,6 \cdot 10^7$	$8,8 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^6$
E90Q†	$1,3 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^9$	$5,9 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^5$

4-Zustandsmodell

Tab. 4.4 Geschwindigkeitskonstanten der Zustandsänderungen nach dem 4-Zustandsmodell. Mit den Konstanten wurden die Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV nach 4-Zustandsmodell (vgl. Abb. 4.1.6) modelliert (*beim Wildtyp zusätzlich bei den angegebenen pH_e-Werte). Bei der rechnergestützten Anpassung des Modells an die experimentellen Daten waren nur k_{12} , k_{22} und k_{23} frei (rot).

	$k_{11} [s^{-1}]$	$k_{12} [s^{-1}]$	$k_{13} [s^{-1}]$	$k_{21} [s^{-1}]$	$k_{22} [s^{-1}]$	$k_{23} [s^{-1}]$	$k_{24} [s^{-1}]$
WT	370	17	90	35	6	7	0,1
(pH _e 9)*	370	35	90	50	5	7	0,05
(pH _e 6)*	300	9	90	30	8	9	0,5
(pH _e 4)*	370	13	90	45	19	21	1,5
H134R	200	21	50	45	15	11	0,1
H134D	250	25	40	50	2	2	0,05
H134N	200	17	40	50	7	3	0,05
H134S	100	30	40	55	5	4	0,1
E123Q	400	22	130	65	16	5	1,4
E123D	300	20	70	30	3	4	0,05
E123T	400	44	130	65	11	12	1,5
E123A	400	33	130	65	21	15	1,4

4.3 Die Anwendung von ChR2 Mutationen in der Optogenetik

Durch die Expression und Aktivierung von ChR2 in Neuronen kann die Zellmembran innerhalb von wenigen Millisekunden depolarisiert werden. Wenn die Depolarisation den Schwellwert für das Auslösen von Aktionspotentialen erreicht, öffnen sich endogene, spannungsgesteuerte Natriumkanäle und die Zelle generiert ein Aktionspotential. Dabei sind die Möglichkeiten der Kontrolle neuronaler Aktivität eng mit den biophysikalischen Eigenschaften von ChR2 verknüpft. So ist es z.B. nicht möglich mit dem Wildtyp eine anhaltende Membrandepolarisation durch einen einzelnen kurzen Lichtpuls hervorzurufen. Da sich der Kanal innerhalb von Millisekunden schließt, repolarisiert das Neuron sobald das Aktionspotential abgeklungen ist. Für eine anhaltende Depolarisation müssen wiederholt Lichtpulse auf die Zelle appliziert werden. Das kann bei hohen Lichtintensitäten nach einigen Minuten zum Tod des Neurons durch Überhitzung führen. Dieses Problem könnte durch eine Verlängerung der Lebenszeit der leitenden Zustände umgangen werden. Daher sind die C128 und D156 Mutanten für diesen Anwendungsbereich eine optimale Lösung.

Auf der anderen Seite hängt die maximale Frequenz, mit der durch kurze Lichtpulse (1-5 ms) zuverlässig Aktionspotentiale ausgelöst werden können, von der ChR2 Kinetik ab. Bei höheren Anregungsfrequenzen sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass jeder Puls ein Aktionspotential auslöst. Der Grenzwert liegt beim Wildtyp, bei optimaler Expression, bei ca. 40 Hz [42]. Dieser Wert konnte durch die Beschleunigung der Kanalkinetiken, wie sie bei den E123 Mutanten beobachtet wurden, nach oben gesetzt werden.

Die relativ kleine Stromamplitude von ChR2 ist bei vielen Anwendungen problematisch. In vielen Fällen reicht die Kanalaktivität nicht aus, um die Zellmembran über den Schwellwert für das Auslösen von Aktionspotentialen hinaus zu depolarisieren. Der Vorteil der nichtinvasiven Steuerung wird dadurch erheblich gemindert. Bei Transfektionen und Transduktionen wirkt dagegen die künstliche Erhöhung der DNA Kopien pro Zelle oft toxisch [43]. Dies geht vermutlich auf einen hohen Anteil fehlgefalteter Kanäle im endoplasmatischen Retikulum zurück. Die Steigerung der ChR2 Aktivität durch optimierte Expression oder erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit würde das Anwendungsspektrum von ChR2 in der Neurophysiologie erheblich erweitern. Die T159C Mutation könnte dieses Problem lösen, da deren Aktivität in Oocyten etwa 10-mal größer im Vergleich zu ChR2-WT war.

Die neurophysiologischen Messungen, die nötig waren, um das Anwendungspotential vielversprechender Varianten zu überprüfen, erfolgten in enger Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Karl Deisseroth (Stanford University) und Thomas Oertner (FMI, Basel). Diese Messungen werden in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

4.3.1 *Step-function opsins* erhöhen die Erregbarkeit von Neuronen

Die *step-function opsins* umfassten anfangs nur die bereits beschriebenen Mutanten C128S, C128T und C128A [78]. Ihre Hauptmerkmale sind die extrem langsamen *off*-Kinetiken, die daraus resultierende höhere Lichtsensitivität der Zellen und die Möglichkeit den Kanal mit, gegenüber der Anregungswellenlänge rotverschobenen Licht schnell zu schließen (Kap. 3.7). Daraus ergibt sich die Möglichkeit den Kanal mit einem relativ kurzen, blauen Lichtpuls geringer Intensität längerfristig zu öffnen und ihn mit grünem oder rotem Licht wieder zu schließen. In der Neurophysiologie könnte somit eine dauerhafte Depolarisation der Zellmembran hervorgerufen werden, die zu einem selbstgewählten Zeitpunkt wieder beendet wird. Daraus resultierte auch der Name *step-function opsins* (SFO), da mit ihnen die Aktivität von Neuronen schrittweise geändert werden kann. Im Idealfall liegt die optisch ausgelöste Depolarisation oberhalb des Schwellwertes für das Auslösen von Aktionspotentialen. Theoretisch würde dann ein kurzer Lichtpuls genügen, um mehrere Aktionspotentiale hintereinander zu generieren.

Ofer Yizhar und Lisa Gunaydin aus Arbeitsgruppe von Karl Deisseroth (Stanford University) führten die Tests der SFO Varianten in Neuronen durch. Sie verwendeten Vektoren von Lentiviren, um die SFO Sequenzen in die Neuronen von Mäusehippocampuskulturen einzuschleusen. Die Expression erfolgte unter der Kontrolle des *CamKIIa* Promotors. Die Konstrukte waren mit EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) fusioniert, um die erfolgreich transduzierten Zellen zu lokalisieren und ihre elektrische Aktivität mittels der *Patch Clamp* Technik überprüfen zu können.

Die kinetischen Eigenschaften der SFO Varianten in Neuronen waren mit denen in Oocyten vergleichbar (Abb. 4.3.1). Die τ -Werte der *off*-Kinetiken der Photoströme von C128T, C128A und C128S lagen nach der Anregung mit einem 10 ms Lichtpuls (470 nm) jeweils bei 1,8 s, 49 s und 108 s. Die *on*-Kinetiken blieben dagegen im unteren Millisekundenbereich. Die durch Licht ausgelöste Depolarisation der Zellmembran blieb aber unterhalb des Schwellwertes für das Auslösen von Aktionspotentialen. Trotzdem war es möglich die Zellmembran eines

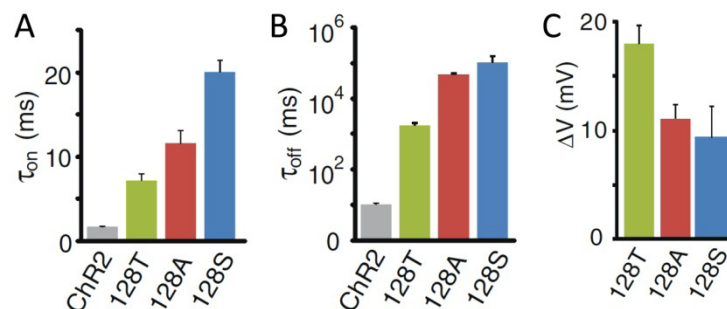


Abb. 4.3.1 Biophysikalische Eigenschaften der SFO Varianten in Hippocampusneuronen von Mäusen. Die Anregung erfolgte mit einzelnen 10 ms Lichtpulsen bei 470 nm **A** τ -Werte der *on*-Kinetik und **(B)** *off*-Kinetik der SFO Photoströme, gemessen im *Voltage Clamp* Modus. Die Kinetiken in Neuronen korrelieren mit den Werten in Oocyten. **C** Durchschnittliche Depolarisation der Neuronenmembran nach Aktivierung des jeweiligen Konstrukts, gemessen im *Current Clamp* Modus. Die Depolarisationsfähigkeit der SFO Varianten war relativ schwach und betrug bei C128A und C128S im Durchschnitt gerade 10 mV. (gemessen von Ofer Yizhar und Lisa Gunaydin, entnommen aus [78])

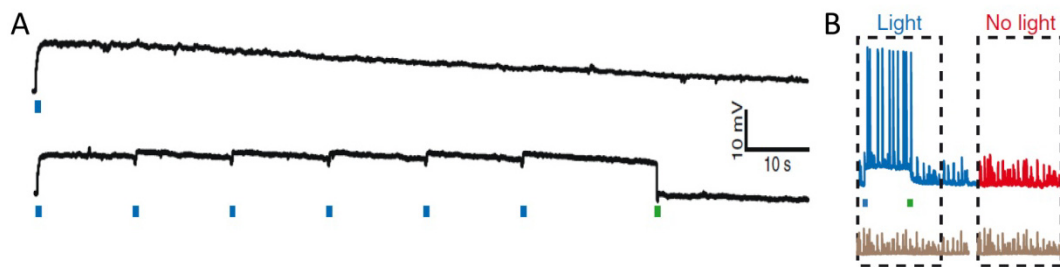


Abb. 4.3.2 Zeitaufgelöster Spannungsverlauf von mit C128S transduzierten Neuronen. **A** Oben: Eine einzelne Anregung mit einem 10 ms Lichtpuls (470 nm, blauer Balken) führte zu einer nur langsam abklingenden Depolarisation. Unten: Die wiederholte Anregung ($\Delta t = 15$ s) depolarisierte das Neuron dauerhaft, wobei es nach Anregung mit grünem Licht (535 nm, 50 ms, grüner Balken) sofort repolarisierte. **B** Die Applikation artifizierender postsynaptischer Potentiale (braune Spuren) löste im Dunkeln keine Aktionspotentiale aus (rote Spur). Die Applikation eines 10 ms Lichtpuls mit 470 nm (blauer Balken) depolarisierte die Membran und die postsynaptischen Potentiale lösten Aktionspotentiale aus (blaue Spur). Nach Applikation eines Grünlichtpulses (535 nm, 50 ms, grüner Balken) war das Neuron nicht mehr elektrisch erregbar. (gemessen von Ofer Yizhar und Lisa Gunaydin, entnommen aus [78])

Neurons, das C128S synthetisierte, um ca. 10 mV zu depolarisieren. Nach der Anregung (10 ms, 470 nm) klang die Depolarisation nur langsam wieder ab (Abb. 4.3.2). Durch die Applikation von Pulsen im Abstand von 15 s konnte eine dauerhafte Depolarisation von 10 mV erreicht werden. Die Applikation von Licht mit einer Wellenlänge von mindestens 535 nm (50 ms) führte zum schnellen Schließen der Kanäle und damit zur Repolarisation der Zellmembran. Auch wenn die Depolarisation nicht ausreichte um Aktionspotentiale auszulösen, so konnte dennoch die Erregbarkeit von Neuronen gegenüber nativen synaptischen Inputs erhöht werden. Um das zu demonstrieren, wurden zunächst native, anregende postsynaptische Potentiale aufgenommen. Diese elektrischen Signale wurden über Elektroden auf Neuronen appliziert, die C128S synthetisierten. Da die Signale zu schwach waren, lösten sie im Dunkeln keine Aktionspotentiale aus. Nach der Applikation eines Lichtpulses (10 ms, 470 nm) depolarisierten die Neuronen um ca. 10 mV und die elektrische Stimulation löste dauerhaft Aktionspotentiale aus. Die Depolarisation der Zellmembran und die Generierung von Aktionspotentialen wurden durch die Applikation von grünem Licht unverzüglich gestoppt (535 nm, 50 ms).

In diesem Fall ist erwähnenswert, dass es Schoenenberger et al. gelungen ist, mit den SFO Varianten direkt Aktionspotentiale auszulösen [39]. Allerdings lässt diese Fähigkeit bei wiederholter Anregung nach. Aus den Messungen dunkeladaptierter C128A Proben in Oocyten wurde ersichtlich, dass die Kanäle nach wiederholter Anregung in einen Gleichgewichtszustand mit niedriger Aktivität übergehen (Abb. 3.7.7). Der Unterschied bei den Messungen von Schoenenberger et. al war, dass sie RFP (*red fluorescent protein*) zu Lokalisation transfizierter Zellen verwendet wurde. Dessen Anregungswellenlänge liegt bei 558 nm und damit weit entfernt vom Anregungsmaximum von ChR2 (470 nm). Unsere Kollegen in Stanford haben dagegen EYFP verwendet, dessen Anregungswellenlänge (514 nm) wesentlich näher am Anregungsmaximum von ChR2 liegt [79]. Deshalb wurden die SFO

Varianten bei der Lokalisation transduzierter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bereits in den Gleichgewichtszustand versetzt. Dagegen blieben die Kanäle bei der Anregung von RFP noch weitgehend im dunkeladaptierten Zustand. Daher generierten sie bei den ersten Anregungen mit 470 nm große Photoströme, die eine deutlich stärkere Depolarisation hervorriefen. Die Kanäle gingen erst nach und nach in den schwach leitenden Gleichgewichtszustand über. Dies wird bei optogenetischen Studien nach einigen Anregungszyklen ohnehin immer geschehen. Deswegen liegt die Hauptanwendung dieser SFO Varianten weiterhin in der Erhöhung der Erregbarkeit von Neuronen gegenüber natürlichen elektrischen Inputs.

4.3.2 ChETA erhöht die Zuverlässigkeit optisch gesteuerter, neuronaler Aktivität

Eine Hauptanwendung von ChR2 liegt in der zeitlich und räumlich präzisen Generierung von Aktionspotentialen. Während die räumliche Auflösung der ChR2 Aktivierung mit der verwendeten Optik und der Lichtintensität zusammenhängt, ist die zeitliche Präzision in erster Linie mit den biophysikalischen Eigenschaften von ChR2 verknüpft.

Die Repolarisation der Zellmembran dauert nach der Generierung eines durch ChR2-WT ausgelösten Aktionspotentials länger als nach elektrisch ausgelösten Aktionspotentialen [41]. Vermutlich hängt dies mit der vergleichsweise langsamen *off*-Kinetik von ChR2-WT zusammen. In der Praxis ergeben sich dadurch einige Probleme. Da die Zellmembran effektiv länger depolarisiert bleibt, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass in dieser Phase weitere Aktionspotentiale ausgelöst werden. Außerdem repolarisieren die Zellen bei hohen Pulsfrequenzen zwischen den Aktionspotentialen nicht vollständig und es entsteht ein sogenanntes Plateau Potential. Dadurch desensitiviert die Zelle und der Schwellwert für das Auslösen von Aktionspotentialen verschiebt sich in Richtung positiver Werte. Infolgedessen sinkt die Wahrscheinlichkeit mit einem Lichtpuls ein Aktionspotential auszulösen. Lisa Gunaydin und Ofer Yizhar von der Stanford University fanden heraus, dass diese Probleme insbesondere bei schnell feuernenden Interneuronen auftreten (Abb. 4.3.3) [71].

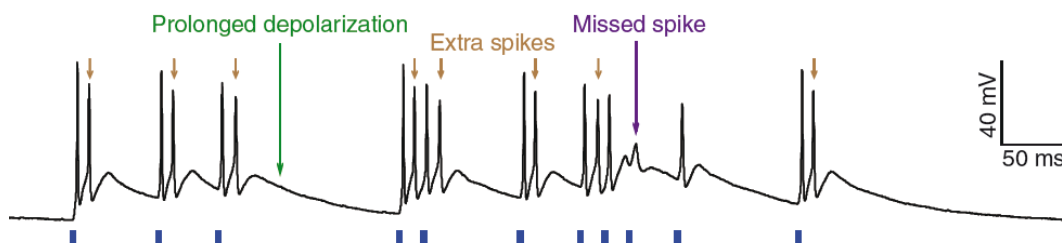


Abb. 4.3.3 Zeitaufgelöster Spannungsverlauf eines mit ChR2-H134R transduzierten Neurons des präfrontalen Mäusegehirns. Das präzise Auslösen von Aktionspotentialen war mit H134R nicht möglich. Die relativ langsame Kanalkinetik bedingte eine langsame Repolarisation (grüner Pfeil), die in zusätzlichen (braune Pfeile) und fehlenden Aktionspotentialen (lila Pfeil) resultierte. (gemessen von Ofer Yizhar und Lisa Gunaydin, entnommen aus [71])

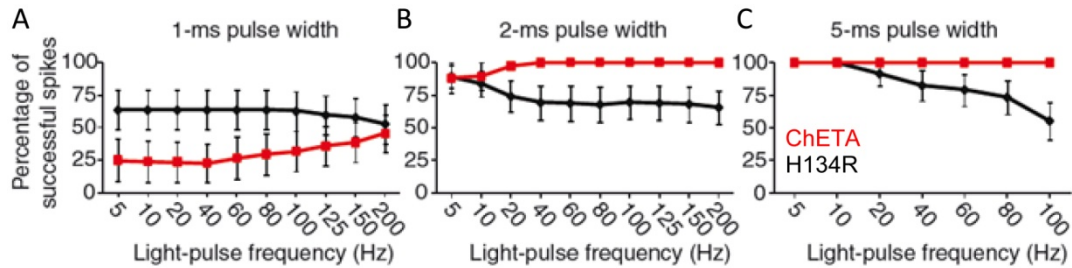


Abb. 4.3.4 Leistungsfähigkeit von ChETA in Interneuronen des präfrontalen Mäusegehirns Aktionspotentiale auszulösen. Mit E123T/H134R (rot) und H134R (schwarz) transduzierte Neuronen wurden mit Lichtpulsen von (A) 1 ms, (B) 2 ms und (C) 5 ms Länge mit Frequenzen zwischen 5 Hz und 200 Hz angeregt. Die ausgelösten Aktionspotentiale wurden anschließend mit der Anzahl applizierter Lichtpulse verglichen und die Zuverlässigkeit in Prozent angegeben. Bei 2 ms Lichtpulsen erreichte ChETA eine Zuverlässigkeit von 100% zwischen 40 Hz und 200 Hz. (gemessen von Ofer Yizhar und Lisa Gunaydin, aus [71])

Mit ChR2-WT und H134R war hier die präzise Generierung von schnellen, natürlichen Aktivierungsmustern durch entsprechende Lichtpulse kaum möglich. E123T zeigte in Oocyten wesentlich schnellere Kinetiken als der Wildtyp (ChR2-E123T accelerated = ChETA). Daher wurde versucht, die Zuverlässigkeit der optisch ausgelösten Aktionspotentiale in Interneuronen durch die Verwendung dieses Konstrukts zu steigern.

ChETA wurde im Labor von Prof. Deisseroth unter der Kontrolle des *Parvalbumin* Promotors spezifisch in Interneuronen des präfrontalen Gehirns von Mäusen exprimiert [71]. Ofer Yizhar und Lisa Gunaydin haben deren elektrische Aktivität mit der *Patch Clamp* Technik an akuten Hirnschnitten überprüft. Allerdings haben sie die Mutation nicht in die Wildtypsequenz eingeführt, sondern die Doppelmutante H134R/E123T generiert, da H134R einen höheren Photostrom als der Wildtyp liefert [49]. Obwohl dadurch die Kinetiken gegenüber E123T etwas langsamer waren, zeigte die Doppelmutante in Interneuronen eine erhebliche Leistungssteigerung gegenüber H134R. Die beiden Konstrukte wurden mit Lichtpulsen von 1 ms, 2 ms und 5 ms Länge und mit Frequenzen zwischen 5 Hz und 200 Hz angeregt. Die Anzahl der applizierten Lichtpulse wurde anschließend mit der Anzahl der generierten Aktionspotentiale verglichen. Der Wildtyp erreichte bei einer Pulslänge von 1 ms bei allen Frequenzen eine höhere Zuverlässigkeit als die ChETA Variante (Abb. 4.3.4). Dagegen erreichte diese bei 2 ms Pulslänge und bei Frequenzen über 40 Hz eine 100prozentige Zuverlässigkeit, während die des Wildtyps bei ca. 70 % lag. Aus den *Current Clamp* Messungen ging hervor, dass Interneurone, die ChETA exprimieren, nach Abklingen des Aktionspotentials schnell repolarisieren. Dadurch konnte auch die Anzahl der zusätzlichen Aktionspotentiale pro Lichtpuls erheblich reduziert werden. Ein weiterer Vorteil der ChETA Varianten ist, dass sie auch bei hohen Pulsfrequenzen kein Plateaupotential bilden (Abb. 4.3.5).

Neuere Messungen an Oocyten ergaben, dass das Schließen von E123T bei allen Spannungen schnell bleibt (Abb. 3.6.6), während es beim Wildtyp mit positiver werdenden Spannungen deutlich langsamer wird. Die Depolarisation von

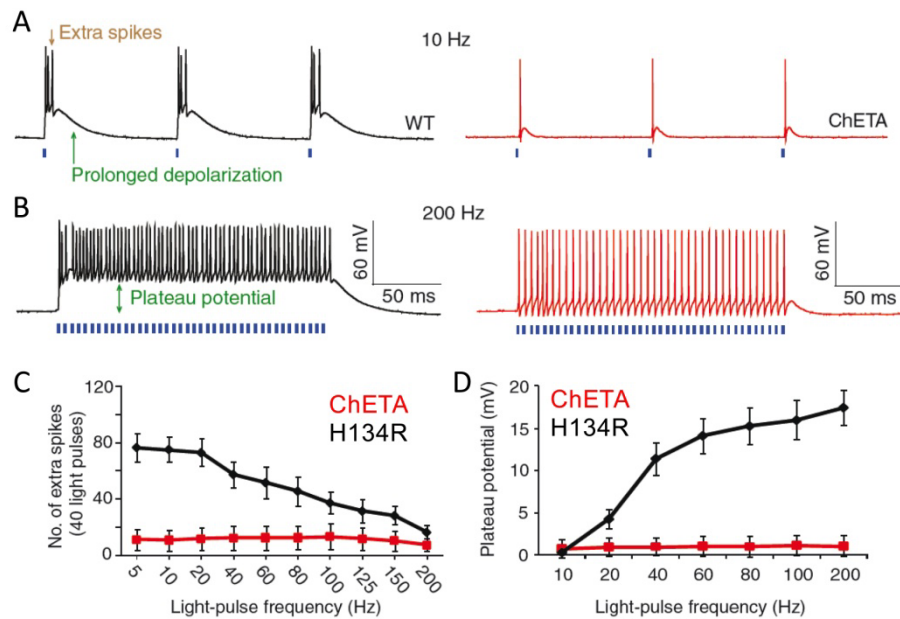


Abb. 4.3.5 Vorteile bei der Verwendung von ChETA in Interneuronen. **A** Spannungsverlauf transduzierter Neuronen nach Lichtanregung mit 10 Hz (blaue Balken). Durch die langsame Kinetik repolarisierte die Zellmembran von mit H134R (schwarz) transduzierten Neuronen nur langsam. Dadurch stieg die Wahrscheinlichkeit nach einer Einzelanregung zusätzlich Aktionspotentiale auszulösen. Mit E123T/H134R (rot) transduzierte Zellen repolarisierten schneller und meist ohne dass zusätzlich Aktionspotentiale ausgelöst wurden. **B** Bei hohen Anregungsfrequenzen (hier 200 Hz) repolarisierte die Zellmembran zwischen den Lichtpulsen nicht vollständig und es bildete sich bei H134R (schwarz) ein Plateaupotential. Die schnelle Kinetik von E123T/H134R (rot) ermöglicht dagegen eine vollständige Repolarisation, weshalb sich kein Plateaupotential bildete. **C** Quantifizierung der Wahrscheinlichkeit zusätzliche Aktionspotentiale bei einzelnen, kurzen Lichtpulsen auszulösen. Die jeweiligen Konstrukte wurden mit jeweils 40 Pulsen (2 ms, 470 nm) bei verschiedenen Frequenzen (5 Hz – 200 Hz) angeregt und die Gesamtzahl der zusätzlichen Aktionspotentiale dargestellt. Die Zuverlässigkeit mit einzelnen Pulsen einzelne Aktionspotentiale auszulösen, war bei ChETA höher als bei H134R. **D** Höhe des Plateaupotentials von H134R (schwarz) und ChETA (rot) bei variierenden Frequenzen (5 Hz-200 Hz). Die Bildung eines Plateaupotentials war bei ChETA signifikant reduziert. (gemessen von Ofer Yizhar und Lisa Gunaydin, aus [71])

Neuronen, die mit der Entstehung eines Aktionspotentials verbunden ist, führte somit zwangsläufig zu einer stetigen Verlangsamung der Kanalkinetik von ChR2-WT, aber auch von H134R und T159C. Dagegen schloss sich E123T während der Generierung von Aktionspotentialen schnell und relativ unabhängig von der Membranspannung. Mit hoher Wahrscheinlichkeit liegt darin der eigentliche Vorteil dieser Mutation. Die Spannung wirkt sich offensichtlich weniger negativ auf das Schließen des Kanals aus, wenn die Konstrukte die E123T Mutation tragen. Deswegen war die Repolarisation des Neurons nach Abklingen des Aktionspotentials schneller als bei der Verwendung von H134R.

4.3.3 T159C liefert große Photoströme in Neuronen

Mit der Anwendung dieser Variante sollte ein sehr zentrales Problem der Optogenetik gelöst werden. Oft sind die Photoströme zu klein und in vielen Fällen reicht die durch ChR2-WT ausgelöste Depolarisation nicht aus, um Aktionspotentiale hervorzurufen. Selbst die Verwendung von starken Promotoren

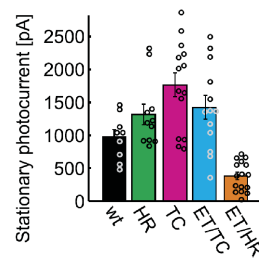


Abb. 4.3.6 Durchschnittliche Photoströme nach der Anregung transfizierter Hippocampusneuronen von Ratten. Zellen die ChR2-WT (wt), H134R (HR), T159C (TC), E123T/T159C (ET/TC) und E123T/H134R exprimierten wurden jeweils mit 473 nm angeregt (0,5 s) und die stationären Stromamplituden im *whole cell* Modus, bei einem Klemmpotential von -65 mV ausgelesen. Kreise kennzeichnen die Werte von Einzelmessungen. T159C produzierte von allen Konstrukten den größten Photostrom. (gemessen von Philipp Schoenenberger, entnommen aus [80])

garantiert nicht, dass jede transfizierte Zelle durch Licht erregbar ist. Das kann besonders dann ein Problem werden, wenn gezielt einzelne Neurone angeregt werden sollen. Die Erhöhung der Anzahl der DNA Kopien pro Zelle zur Steigerung der ChR2 Expression wirkt dagegen oft toxisch. Daher wäre eine Steigerung der ChR2 Aktivität, durch optimierte Expression oder eine gesteigerte Einzelkanalleitfähigkeit wünschenswert.

Die Einzelmutation T159C hatte in Oocyten gegenüber dem Wildtyp einen ca. 10-mal größeren stationären Strom (Abb. 3.6.1). Obwohl nicht klar war, worin die genaue Ursache dafür liegt, vermutete ich, dass sich dieser Effekt auch auf Neuronen übertragen lässt. Die ersten Messungen am FMI in Basel zeigten, dass T159C in relativ kurzer Zeit nach der Transfektion einen annähernd doppelt so großen Photostrom wie der Wildtyp generiert (Abb. 3.6.5).

Philipp Schoenenberger führte weitere, detailliertere Messungen durch, um das Potential dieser Mutation genauer zu untersuchen. Dabei erfolgte der direkte Vergleich nicht nur zu ChR2-WT, sondern auch zu H134R und E123T/H134R [80]. Die Doppelmutation E123T/T159C wurde in die Studie mit einbezogen, weil die T159C Kinetiken langsamer als die des Wildtyps und eindeutig spannungsabhängig waren. Die DNA-Sequenzen wurden mittels einer „gene gun“ in die Neuronen von Rattenhippocampuskulturen eingeschleust und unter der Kontrolle des *Synapsin-1* Promotors synthetisiert. Hier bestätigte sich, dass T159C einen ca. 70% größeren Photostrom als der Wildtyp generiert (Abb. 4.3.6). Die Werte lagen sogar über denen von H134R. Auch die Doppelmutante E123T/T159C zeigte eine deutlich höhere Aktivität, die mit der von H134R vergleichbar war. Allerdings beinhaltet diese Doppelmutation bereits die vorteilhaften kinetischen Eigenschaften, die mit E123T verknüpft sind (Abb. 3.6.6), während E123T/H134R sehr kleine Photoströme lieferte.

Die Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, Aktionspotentiale bei unterschiedlichen Lichtpulsfrequenzen und unter variierenden Lichtintensitäten auszulösen (Abb. 4.3.7). Wenn bei transfizierten Zellen 80% der Lichtpulse ein Aktionspotential auslösten, galt dies pauschal als gute Leistung. Hier zeigte sich, dass T159C und E123T/T159C zuverlässiger waren als der Wildtyp und H134R. Die Einzel- und die Doppelmutation stellen durch ihre unterschiedlichen

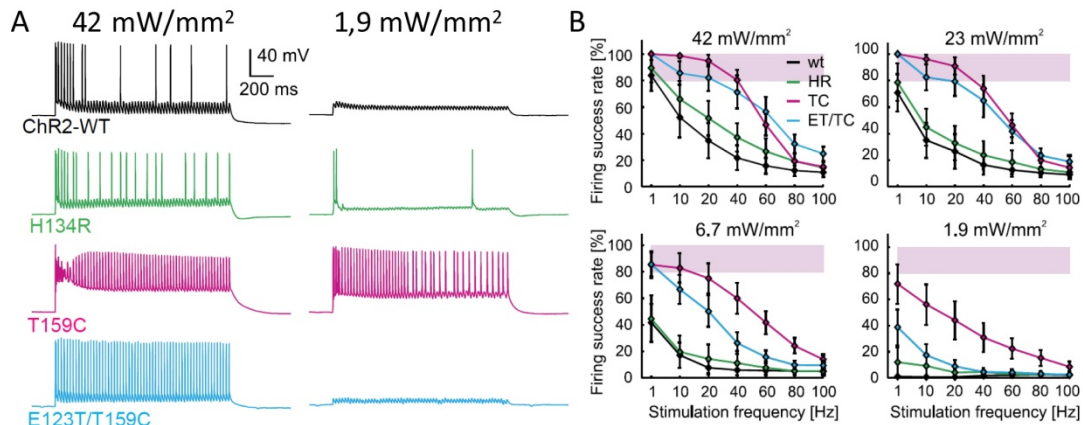


Abb. 4.3.7 Erregbarkeit von Neuronen mit T159C und E123T/T159C im Vergleich zu ChR2-WT und H134R. **A** Typische Spannungsverläufe der Neuronen nach Anregung mit 2 ms Lichtpulsen (60 Hz, 473 nm) bei hohen (links, 42 mW/mm²) und niedrigen (rechts, 1,9 mW/mm²) Lichtintensitäten. Bei hohen Intensitäten feuerten nur mit T159C und E123T/T159C transfizierte Neuronen zuverlässig Aktionspotential. Bei T159C bildete sich aber ein großes Plateaupotential. Bei niedrigen Intensitäten feuerte nur das T159C Neuron zuverlässig. **B** Anregung von ChR2-WT (wt), H134R (HR), T159C (TC) und E123T/T159C (ET/TC) mit 2 ms Lichtpulsen bei verschiedenen Lichtintensitäten und Stimulationsfrequenzen (1 Hz – 100 Hz). Dargestellt ist das Verhältnis der Anzahl erfolgreich ausgelöster Aktionspotentiale zur Anzahl applizierter Lichtpulse. Eine zuverlässige Leistung galt ab einer Erfolgsrate von mindestens 80% (roter Balken). Zusätzliche Aktionspotentiale bei einer Einzelanregung wurden nicht berücksichtigt. Am zuverlässigsten wurden Aktionspotentiale von T159C und E123T/T159C ausgelöst, insbesondere bei niedrigen Intensitäten. (gemessen von Philipp Schoenenberger, entnommen aus [80])

Eigenschaften optimale Lösungen für verschiedene Anwendungsbereiche dar. T159C hat einen sehr großen Photostrom aber auch eine langsamere *off*-Kinetik als der Wildtyp. Dadurch kam es während einer Einzelanregung und bei hohen Lichtintensitäten zum Auftreten von zusätzlichen Aktionspotentialen. Dieses Problem nahm allerdings bei geringen Lichtintensitäten ab, bei denen T159C von allen Varianten auch die höchste Zuverlässigkeit zeigte. Außerdem war der Anteil von transfizierten Zellen, die eine Zuverlässigkeit von mindestens 80% erreichten bei T159C am höchsten (Abb. 4.3.8). Daher kommt diese Variante vor allem für Anwendungen in Frage, bei denen eine schwache Expression zu erwarten ist, z.B. für die Herstellung transgener Organismen, sowie für Anwendungen bei denen nur schwache Lichtintensitäten verwendet werden sollten, wie z.B. Langzeitstimulationen *in vivo*. Dagegen stellt E123T/T159C für das zeitlich präzise Auslösen von Aktionspotentialen bei höheren Lichtintensitäten die bessere Lösung dar. Die Plateaupotentiale sowie die Wahrscheinlichkeit mehrere Aktionspotentiale pro Lichtpuls auszulösen, waren bei dieser Variante geringer. Obwohl die Photoströme nicht viel größer waren als die von H134R, waren die Zuverlässigkeit und zeitliche Präzision der Doppelmutante höher. Das liegt wahrscheinlich zum einen an der schnelleren *on*- und *off*-Kinetik und zum anderen an der Spannungsunabhängigkeit des Schließvorganges (Abb. 3.6.6). In Verbindung mit den größeren Photoströmen ist E123T/T159C damit bei allen Anwendungen ChR2-WT und H134R überlegen.

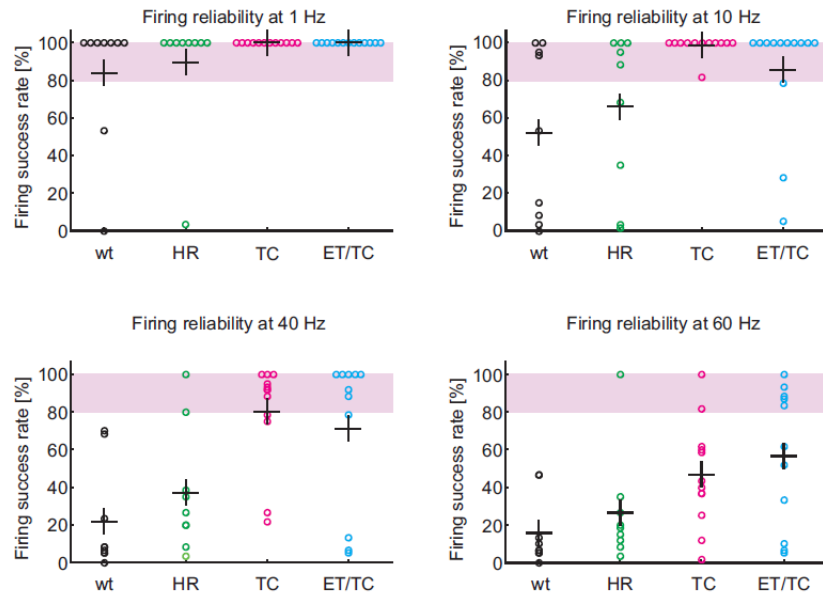


Abb. 4.3.8 Erregbarkeit von mit ChR2 transfizierten Neuronen. ChR2-WT (wt), H134R (HR), T159C (TC) und E123T/T159C (ET/TC) exprimierende Neuronen wurden mit 2 ms Lichtpulsen bei 42 mW/mm² angeregt. Die Frequenz betrug jeweils (A) 1 Hz, (B) 10 Hz, (C) 40 Hz und (D) 60 Hz. Dargestellt ist das Verhältnis der Anzahl erfolgreich ausgelöster Aktionspotentiale zur Anzahl applizierter Lichtpulse von einzelnen Neuronen (Kreise). Ein Neuron löste zuverlässig Aktionspotentiale aus, wenn die Erfolgsrate bei mindestens 80% lag (roter Balken). Bei hohen Frequenzen waren die Chancen erfolgreich Aktionspotentiale auszulösen bei den Neuronen am größten, die T159C oder E123T/T159C exprimierten. (gemessen von Philipp Schoenenberger, aus [80])

4.4 Ausblick

Die hier vorgenommenen Experimente geben eine Vorstellung davon, wie der Ionentransport bei ChR2 funktioniert. Um den Mechanismus vollständig verstehen zu können, sind aber zweifelsohne weitere Untersuchungen nötig. Die *Two Electrode Voltage Clamp* Technik bietet zwar hohe Durchsatzraten, aber es war nicht möglich, die intrazelluläre Ionenzusammensetzung zu variieren. Das ist aber eine Voraussetzung, um die Permeabilität der geleiteten Ladungsträger genau berechnen zu können. Hierfür bieten sich elektrophysiologische Messungen mit HEK-Zellen an. Damit könnte zum Beispiel festgestellt werden, ob der Ausstrom der E90 Mutanten unter sauren extrazellulären Bedingungen tatsächlich von Kalium stammt, da hierfür der intrazelluläre pH_e-Wert gesenkt werden müsste. Außerdem könnte damit das Verhältnis der Permeabilität von Natrium- und Kaliumionen genauer bestimmt und für eine genauere Modellierung verwendet werden. Die Gesamtzahl aktivier Kanäle war ein wichtiger Faktor für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten des Ladungstransports. Hier ging ich von einer gleichbleibenden Expressionsrate bei allen Mutanten aus. Leider gibt es für Oocyten keine adäquate Methode, eventuelle Expressionsunterschiede zwischen den Konstrukten zu bestimmen. Hier bieten HEK-Zellen den Vorteil, dass man mit

geeigneten Fluoreszenzassays eine Abschätzung der Expressionslevel vornehmen kann.

Die Berechnung der Stromamplituden mit dem *Two Barrier* Modell verdeutlichte, wie die Ionenleitung in ChR2 funktioniert. Damit war es möglich den Einfluss der mutierten Aminosäuren auf den Transport und die Bindung von Ladungsträgern abzuschätzen. Für eine genauere Analyse muss das Modell aber zukünftig erweitert werden. Wahrscheinlich gibt es gerade unter basischen und neutralen Bedingungen einen größeren Beitrag von einströmenden bivalenten Kationen, der vermutlich von Mutante zu Mutante unterschiedlich ist und hinter dem sich wichtige Aspekte des Transportmechanismus verbergen könnten. Dazu müssten zunächst Messungen mit variierenden Calcium- und Magnesiumkonzentrationen durchgeführt und die Leitung dieser Ladungsträger im Modell berücksichtigt werden. Die Messungen mit den E90 Mutanten zeigten aber, dass die Bindung intrazellulärer Ionen unabhängig von der Bindung extrazellulärer Ladungsträger stattfinden kann. Für eine Trennung dieser Vorgänge muss und kann das Transportmodell um mindestens eine weitere Bindungsstelle erweitert werden. Durch die Modellierung der Amplituden der E90-Mutationen mit einem *Three Barrier* Modell, könnte sich die Vermutung bestätigen, dass diese Position eine zentrale Rolle bei der Protonenleitung einnimmt.

Für weitere Mutationsstudien bieten sich Substitutionen auf Basis von T159C an. Die Kinetik und die Umkehrpotentiale hatten sich gegenüber dem Wildtyp zwar leicht verändert, aber die großen Photoströme von T159C bieten einige Vorteile. Einzelmutationen wie E123D, D253N oder E90D führten zu einer deutlichen Reduzierung der Kanalaktivität. Oft konnten mit diesen Varianten keine Experimente durchgeführt werden, weil die Photoströme zu klein waren. Weitere Mutationsstudien wären dagegen auf einem T159C Hintergrund einfacher und schneller realisierbar, weil man nicht mehr von einer optimalen Expression abhängig wäre.

Die Funktion der Deprotonierung und Reprotonierung der Schiffbase bei der Aktivierung von ChR2 bleibt weiterhin unklar. Mutationen in der Nähe des aktiven Zentrums riefen zwar Veränderungen bei der Kanalkinetik und beim Transport hervor, führten aber nicht zwangsläufig zu einer reduzierten Aktivität, wie bei anderen mikrobiellen Rhodopsinen. Vorgänge an der Schiffbase können sehr gut mit spektroskopischen Messungen im UV/Vis-Bereich beobachtet werden. Studien mit E123, H134 und D253 Mutanten könnten dabei helfen den Aktivierungsmechanismus von ChR2 besser zu verstehen.

Auch wenn es zwischen dem Photozyklusmodell und dem 4-Zustandsmodell einige Abweichungen gibt, so ergibt sich letzteres zwingend aus den Stromspuren und beschreibt die grundlegenden Prozesse, wie die Öffnung und das Schließen des Kanals sowie das Gleichgewicht zwischen den beiden Zyklen. Dennoch könnte man die Modellierung der an die experimentellen Daten verbessern, indem weitere Intermediate berücksichtigt werden. Messungen mit den hier vorgestellten Mutanten könnten für eine genauere spektroskopische Unterscheidung der einzelnen Übergänge hilfreich sein. Beispielsweise hat H134D eine sehr schnelle

Inaktivierung, während die *off*-Kinetik sehr langsam ist. Das gilt auch für H134N, wobei sich hier die *Recovery* Kinetik nur wenig von der des Wildtyps unterscheidet. Dagegen ist dieser Übergang bei E90H inhibiert und der Kanal akkumuliert im zweiten Zyklus. Da die *Recovery* Kinetik photochemisch induziert werden kann, bieten sich spektroskopische Messungen an, durch den die Mechanismen dieses Übergangs aufgeklärt werden könnten.

Früher oder später wird es von ChR2 eine Röntgenstruktur geben, die ein sehr wichtiger Beitrag für das Verständnis des ChR2 Mechanismus wäre. Die Diskussion über die Funktion von Aminosäuren muss dann auch im Zusammenhang mit den Mutationsstudien geführt werden. Bis dahin wird es vermutlich weitere Homologiemodelle von ChR2 geben. Hierfür sind spektroskopische und elektrophysiologische Daten von noch größerer Bedeutung, da durch sie die vermeintliche Funktion einer Aminosäure im Modell experimentell verifiziert werden kann.

Anhang

Two Electrode Voltage Clamp

Die *Voltage Clamp* Technik wurde 1949 von Cole, Hodgkin und Huxley entwickelt, um die Weiterleitung elektrischer Signale in Riesenaxonen von Tintenfischen zu untersuchen [81,82]. Dabei wird das Membranpotential (E_m) auf einen konstanten Wert, dem so genannten Klemmpotential (E_{cmd}) fixiert und die dabei auftretenden Membransströme (I_m) gemessen. Da Membranströme eine Veränderung des Membranpotentials hervorrufen, muss innerhalb der Zelle ein gleich großer, aber entgegengesetzter Strom (I_{cmd}) appliziert werden, damit $E_{cmd} = E_m$ bleibt. Dieser Strom stellt gleichzeitig die Messgröße bei dieser Technik dar.

Beim *Two Electrode Voltage Clamp* (TEVC), einer Variation der *Voltage Clamp* Technik erfolgt die Messung der Membranspannung und die Stromapplizierung separat, über zwei intrazelluläre Mikroelektroden (Abb. A.1) [44]. Da das Potential außerhalb der Zelle konventionsgemäß bei null liegen muss, fließen die applizierten Ströme dort über eine geerdete Referenzelektrode, die so genannte Badelektrode ab (Abb. A.2). Prinzipiell kann man die Amplitude des Membranstroms über I_{cmd} an der Stromelektrode oder über den, durch die Badelektrode fließenden Strom (I_b) messen.

Ein realer TEVC Aufbau unterscheidet sich von dem in Abb. A.2 gezeigten Aufbau in zwei wichtigen Punkten. Erstens durch die Einführung einer negativen Rückkopplungsschleife und zweitens durch die Verwendung einer so genannten „virtuellen Masse“ (Abb. A.3). Durch die Rückkopplungsschleife findet der Abgleich des Membranpotential mit dem Klemmpotential gleichzeitig und automatisch statt. Dadurch sind Reaktionszeiten im Millisekundenbereich realisierbar. Mit Hilfe der virtuellen Masse stellt man sicher, dass das extrazelluläre Potential immer bei null liegt. Der Differenzverstärker A1, ein so genannter Spannungsfolger leitet die an der Potentialelektrode gemessene Spannung an den



Abb. A.1 Ag/AgCl Mikroelektrode für intrazelluläre Ableitungen. Eine ausgezogene Borosilicatglaskapillare teilweise befüllt mit einer 3 M KCl Lösung (blau), in die ein von AgCl ummantelter Silberdraht getaucht ist. Die KCl Lösung steht mit dem Außenmedium, über eine schmale Öffnung an der Spitze der Kapillare in Kontakt. Längenangaben beziehen sich auf die Durchmesser der Glaskapillare an ihren Enden. Der Durchmesser an der Spitze bestimmt maßgeblich den Widerstand der Elektrode. (OD: Außendurchmesser, ID: Innendurchmesser)

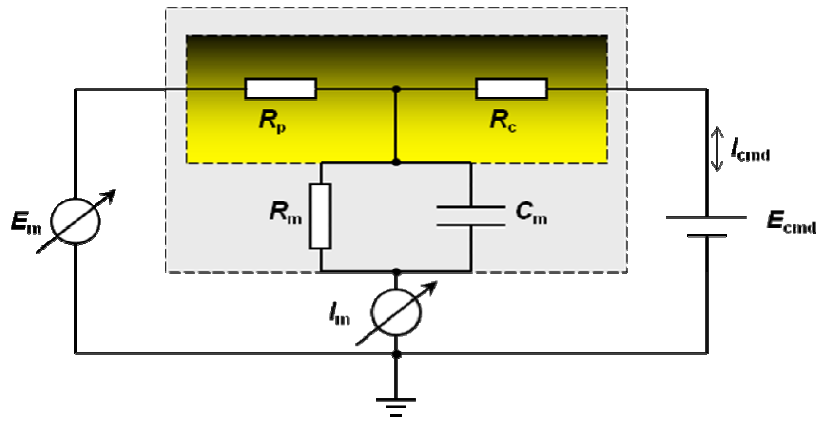


Abb. A.2 1 Darstellung des TEVC Konzepts. Der grau markierte Bereich symbolisiert die Zellmembran mit den Membranwiderstand R_m und der Membrankapazität C_m . Gelbbraun markiert das Zellinnere mit zwei injizierten Mikroelektroden, die durch ihre Widerstände R_p (Potentialelektrode) und R_c (Stromelektrode) dargestellt sind. Hierbei ist $R_p \gg R_c$. Es gibt zwei parallel geschaltete Stromkreise: Links wird die Membranspannung gemessen. Rechts erfolgt die Stromapplizierung I_{cmd} , sobald ein Membranstrom (I_m) fließt und dadurch E_m von E_{cmd} abweicht. Das Außenmedium ist durch eine Referenzelektrode geerdet, gegen die E_m gemessen wird.

Verstärker weiter. A1 hat einen hohen Innenwiderstand, so dass die Potentialelektrode weitgehend stromfrei bleibt. Im Differenzverstärker A2 wird die Membranspannung mit dem Klemmpotential verglichen. Bei Abweichungen appliziert der Verstärker einen entsprechenden Strom, der über die niedrigohmige Stromelektrode weitergegeben wird.

Aus technischen Gründen reicht eine einfache Erdung der Referenzelektrode nicht aus. Um ein Außenpotential von null beizubehalten, muss der Membranstrom kompensiert werden. Dieser Ausgleich erfolgt über die Referenzelektrode. Allerdings besitzt diese einen Widerstand über den ein Potential abfällt, das sich bei der Messung zum Membranpotential addiert. Durch die Verwendung einer virtuellen Masse kann man diesen Fehler minimieren. Dabei liegen zwei AgCl Elektroden (R_b , R_s) im Außenmedium, die zusammen mit einem Operationsverstärker (A3) eine negative Rückkopplung bilden. Das Ausgangssignal des Differenzverstärkers ($-E_s$) entspricht dem negativ invertierten Potential, das von der *sense*-Elektrode gemessen wird (E_s). Dadurch wird über die Badelektrode ein Strom appliziert (I_b), der dem Membranstrom entspricht, aber in entgegengesetzter Richtung verläuft. Dadurch wird erreicht, dass die *sense*-Elektrode stromfrei bleibt und das extrazelluläre Potential bei null liegt. Mathematische Erläuterungen zur Funktionsweise der Differenzverstärker finden sich im nächsten Abschnitt.

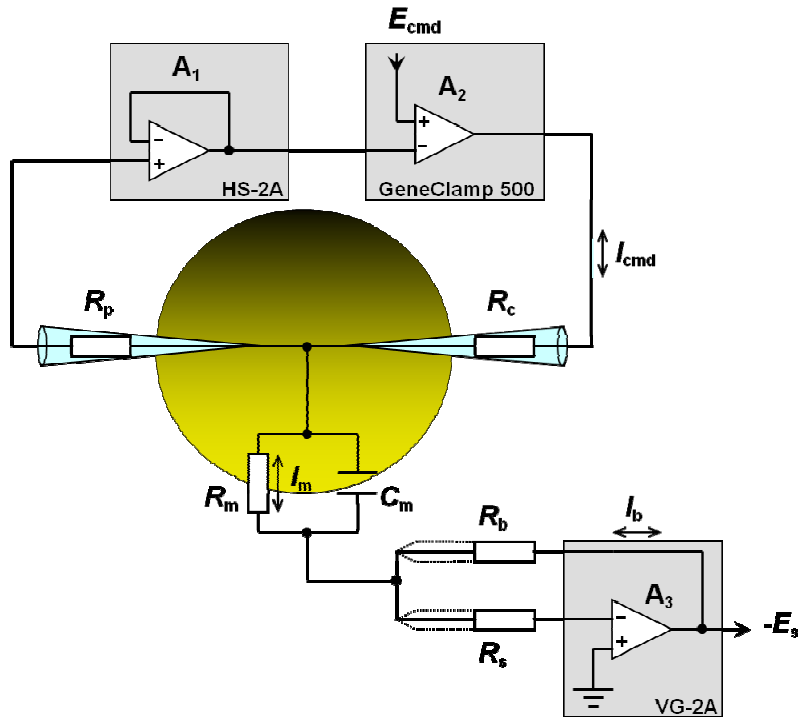


Abb. A.3 Schematische Darstellung einer realen TEVC Schaltung. Mit dieser Anordnung erfolgt die Messung des Membranpotentials, der Vergleich mit dem Klemmpotential und die Stromapplizierung automatisch. Grau hinterlegte Bereiche symbolisieren die technischen Geräte, in denen die jeweiligen Bestandteile realisiert sind. In der Oocyte (gelbbraun) befinden sich Mikroelektroden (blau), dargestellt durch ihre Widerstände R_p (Potentialelektrode) und R_c (Stromelektrode). A_1 , A_2 und A_3 sind Operationsverstärker. A_1 und A_2 sind Teil der Rückkopplungsschleife die E_{cmd} mit E_m abgleicht. A_3 bildet zusammen mit der extrazellulären Bad- (R_b) und Sense-Elektrode (R_s) die virtuelle Masse. Ihre Ausgangsspannung $-E_s$ dient als Referenz für das Membranpotential. E_s ist das extrazelluläre Potential. Die Stromrichtung von I_{cmd} und I_b , hängt von der Richtung von I_m ab. (nähere Erläuterungen im Text)

Operationsverstärker

Ein einfacher Differenzverstärker (Abb A.4 A) verstärkt die Differenz zwischen den Eingangsspannungen E_- und E_+ um den Faktor A .

$$E_o = A(E_+ - E_-)$$

Ein Spannungsfolger (Abb. A.4 B) gibt als Ausgangssignal die Spannung am positiven Eingang (E_+) wieder. Durch einen hohen Eingangswiderstand erfolgt die Messung weitgehend stromfrei. Der Input wird von nachfolgenden Geräten entkoppelt und in gleich bleibender Höhe an sie weitergeleitet.

$$E_o = A(E_+ - E_o)$$

$$E_o = \frac{A}{A+1} \approx E_+ \quad \text{mit} \quad A \gg 1$$

Die virtuelle Masse in Abbildung A.4 C ist eine negative Rückkopplungsschleife, in der der Output auf den invertierenden Eingang (E_-) geleitet wird und das dort ankommende Signal abschwächt. Da der positive Eingang (E_+) durch die Erdung auf dem Potential null liegt, liegt die Outputspannung (E_o), wegen der dynamischen Rückkopplung ebenfalls bei null:

$$E_o = A(E_+ - (E_- + E_o)) \quad \text{mit} \quad E_+ = 0$$

$$E_o = -\frac{A}{A+1} E_- \approx -E_- = 0 \quad \text{mit} \quad A \gg 1$$

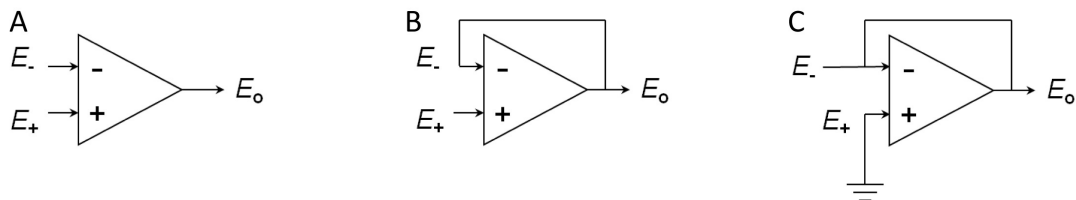


Abb. A.4 Typen von Operationsverstärkern. A zeigt einen einfachen Differenzverstärker mit den zwei Eingangsspannungen E_+ und E_- sowie dem Ausgangssignal E_o . In B sieht man einen Spannungsfolger bzw. Impedanzwandler, bei dem das Ausgangssignal gleichzeitig ein Eingangssignal bildet. C zeigt eine virtuelle Masse bzw. einen invertierenden Verstärker. Hier wird das Ausgangssignal zu dem invertierten Eingangssignal addiert. Die Abbildungen vernachlässigen Eingangs- und Innenwiderstände.

Primer für site directed mutagenesis

Tab. A.1 ChR2 Einzelmutationen und dafür verwendete Vorwärts-Primer

Mutation	5' Vorwärts-Primer 3'	T _m [°C]
E123D	GTTGCGTTACGCCGACTGGCTTCTCACCTG	80,6
E123Q	GTTGCGTTACGCCCAGTGGCTTCTCACCTG	80,5
H134N	GCCCGGTCATTCTCATTAACCTGTCAAACCTGACG	80,1
D253N	CGTCGGCCACACCATCATTAACCTGATGTCTGAAGAACTG	82,1
D253E	GGCCACACCATCATTGAGCTGATGTCTGAAGAACTG	80,1
H134D	CCCGGTCATTCTCATTGACCTGTCAAACCTGACG	80,4
H134R	CCCGGTCATTCTCATTCGCCTGTCAAACCTGACG	81,6
C128T	CCGAGTGGCTTCTCACCAACCCGGTCATTCTCATTC	80,5
E90Q	GATCTATGTGTGCGCTATCCAGATGGTCAAGGTGATTCTC	80,0
E235Q	GTTTCATCTCGGCCCCAGGGCTTCGGC	82,5
K93Q	CGCTATCGAGATGGTCCAGGTGATTCTCGAGTTC	80,4
E90D	CTATGTGTGCGCTATCGACATGGTCAAGGTGATTCTC	80,3
E90H	GAGATCTATGTGTGCGCTATCCACATGGTCAAGGTGATTCTC GAG	79,6
E90K	GATCTATGTGTGCGCTATCAAGATGGTCAAGGTGATTCTC	80,1
E123T	GTTGCGTTACGCCACGTGGCTTCTCAC	73,3
C128S	CGAGTGGCTTCTCACCTCCCGGTCATTCTCATTC	82,6
C128A	CGAGTGGCTTCTCACCGCCCGGTCATTCTCATTC	80,8
D156N	CATGGGTCTGCTTGTGTCTAATATTGGCACAATTGTGTGG	80,1
D156A	GGGTCTGCTTGTGTCTGCTATTGGCACAATTGTGTG	80,2
E123A	GTTGCGTTACGCCGCGTGGCTTCTCAC	78,3
E90L	GATCTATGTGTGCGCTATCCTGATGGTCAAGGTGATTCTCG	80,1
E90A	CTATGTGTGCGCTATCGCGATGGTCAAGGTGATTCTC	80,1
T159C	GCTTGTGTCTGATATTGGCTGTATTGTGTGGGGCGCCACTTC	79,7
T159M	GTGTCTGATATTGGCATGATTGTGTGGGGCGCCAC	78,4
E123L	CAGTGGTTGCGTTACGCCCTGTGGCTTCTCACCTG	80,8

Mathematica Programmcodes

```

points = Import["H:\Model\E90H\dataE90Ho4.xls"];
W = 1/25.69;
Mc = 0.1;
Hc = 6.30957344480192 10^-8;
U = e0.5*E*W/2;
V = e-0.5*E*W/2;

f1 = FindFit[points,
((1.602176462 10^-19) * (10^9) * (1333333)) *
(k-1M*k-1H * (Hc*k1H*k-2H*U2 * (k-2M*U + k1M*V) + Mc*k1M*k-2M*U2 * (k-2H*U + k1H*V) -
V2 (He*k1H*k-2H * (k-2M*U + k1M*V) + Me*k1M*k-2M * (k-2H*U + k1H*V)))) /
(k-1M*k-1H*k-2M*k-2H*U2 + k1H*k-1M*k-1H*k-2M*U*V + k1M*k-1M*k-1H*k-2H*U*V +
He*k1H*k-1M*k-2M*k-2H*U*V + Me*k1M*k-1H*k-2M*k-2H*U*V +
k1M*k1H*k-1M*k-1H*V2 + Me*k1M*k1H*k-1H*k-2M*V2 + He*k1M*k1H*k-1M*k-2H*V2 +
Hc*(k1H)2*k-1M*U*(k-2M*U + k1M*V) + Mc*(k1M)2*k-1H*U*(k-2H*U + k1H*V)),
{{k-2M, 10^4, 10}, {k-1M, 10^4, 100000}, {k1M, 10^4, 10},
{k-2H, 10^10, 10^12}, {k-1H, 10^9, 10^11}, {k1H, 10^10, 11^11}},
{He, Me, E}, MaxIterations -> 1000000 ]

```

Anpassung der experimentellen Daten an das Two Barrier Modell mit Mathematica 5.2

Oben: Die experimentellen Daten der IV-Messungen wurden als absolute Werte in Nanoampere und Millivolt importiert. W ist die absolute Größe des Ausdrucks $F/R*T*1000$ mit der Gaskonstante R , der Faradaykonstante F und der Temperatur $T = 298$ K. Die Division durch 1000 war aufgrund der Angabe der Spannung in Millivolt nötig. Mc und Hc sind die cytosolischen Konzentrationen für monovalente Kationen und Protonen in mol/l. Mitte: Vor der Gleichung, die den Ladungstransport durch ein einzelnes ChR2 Molekül beschreibt, befinden sich die Parameter, die ihn auf die makroskopischen Photoströme skalieren: $1,6*10^{-9}$ (Größe der Elementarladung), 10^9 (Umrechnungsfaktor von Ampere auf nA), $1,3*10^6$ (Anzahl der ChR2 Moleküle in der Oocytenmembran). Unten: Bei den gesuchten Geschwindigkeitskonstanten für den Transport von monovalenten Kationen (k_{-2M} , k_{-1M} , k_{1M}) und Protonen (k_{-2M} , k_{-1M} , k_{1M}) handelt es sich um die Basiskonstanten k^0 . Für sie wurden jeweils zwei Startwerte gewählt.

Anpassung des 4-Zustandsmodells an die Kanalkinetiken von ChR2

Mit dem folgenden Programm wird das in Abb. 4.1.6 gezeigte Modell an die Stromspuren von ChR2 bei -100 mV angepasst. Damit sollten die Geschwindigkeitskonstanten gefunden werden, die die experimentellen Kinetiken reproduzieren.

```
<< LinearAlgebra`MatrixManipulation`
c1bel = {};
c2bel = {};
o1bel = {};
o2bel = {};
curbel = {};
param = {};
```

Definition von Listen, die für den zeitlichen Verlauf der Besetzungswahrscheinlichkeiten der einzelnen Zustände (O1, O2, C1, C2) sowie für den Gesamtstrom genutzt werden. *Curbel* beinhaltet den zeitlichen Verlauf des Gesamtstroms. In *param* werden die Werte für die Konstanten gespeichert.

```
zahl = 1;
```

Die Variable *zahl* speichert die Gesamtanzahl der Durchläufe.

```
belichtung = 1;
gap = 1;
dt = 0.001;
```

belichtung definiert die Dauer der Belichtung (1 s).
gap definiert die Pausenlänge zwischen zwei Pulsen.
dt ist die zeitliche Auflösung der simulierten Stromspuren (1 ms)

```
k11 = 370;
k12 = 15;
k13 = 90;
k21 = 35;
k22 = 1;
k23 = 1;
k24 = 0.04;
g1 = 20;
g2 = 1;
```

Definition der Geschwindigkeitskonstanten (*k*) und der pauschalen Leitfähigkeiten von O1 und O2 (*g1*, *g2*). *k12*, *k22* und *k23* werden während der Modellanpassung variiert, die restlichen Konstanten bleiben unverändert. *k11* und *k21* sind lichtabhängig und nur bei der simulierten Lichtapplikation $\neq 0$.

```
Do [
  sol = DSolve[{
    c1'[t] == -k11 c1[t] + k13 o1[t] + k24 c2[t] + k22 o2[t],
    o1'[t] == -k12 o1[t] - k13 o1[t] + k11 c1[t],
    c2'[t] == -k21 c2[t] - k24 c2[t] + k23 o2[t] + k12 o1[t],
    o2'[t] == -k22 o2[t] - k23 o2[t] + k21 c2[t],
    c1[0] == 1,
    c2[0] == 0,
    o1[0] == 0,
    o2[0] == 0
  },
    {c1[t], c2[t], o1[t], o2[t]},
    t
  ];
```

Beginn der Programmschleife mit der Berechnung des Differentialgleichungssystems nach Aktivierung des Kanals. Die Besetzungswahrscheinlichkeit des Zustands C1 vor Beginn der Anregung ist 1.


```

b0 = First[g1*o1[t] + g2*o2[t] /. sol // Simplify];
b1 = First[o1[t] /. sol // Simplify];
b2 = First[o2[t] /. sol // Simplify];
b3 = First[c1[t] /. sol // Simplify];
b4 = First[c2[t] /. sol // Simplify];

t = 0;
AppendTo[curbel, {t, -N[b0]}];
For[t = 0, t < belichtung, {AppendTo[curbel, {t, -N[b0]}]}, t = t + dt];

g1AbSt = b1;
g2AbSt = b2;
d1AbSt = b3;
d2AbSt = b4;

ClearAll[t];

xxx = Head[g1AbSt];
If[xxx == Real,
  sol2 = DSolve[{
    c1'[t] == k13 o1[t] + k24 c2[t] + k22 o2[t],
    o1'[t] == -k12 o1[t] - k13 o1[t],
    c2'[t] == -k24 c2[t] + k23 o2[t] + k12 o1[t],
    o2'[t] == -k22 o2[t] - k23 o2[t],
    c1[0] == d1AbSt,
    c2[0] == d2AbSt,
    o1[0] == g1AbSt,
    o2[0] == g2AbSt
  },
    {c1[t], c2[t], o1[t], o2[t]},
    t
  ];

b00 = First[g1*o1[t] + g2*o2[t] /. sol2 // Simplify];

For[t = 0, t < gap, {AppendTo[curbel, {t + belichtung, -N[b00]}]}, t = t + dt];
ClearAll[t];

```

Zweite Berechnung des Differentialgleichungssystems nach Ende der Lichtapplikation zur Simulation der *off*-Kinetik. Dabei werden die Gleichgewichtsbedingungen der ersten Berechnung als Anfangsbedingungen (*AbSt) verwendet. Da die lichtabhängigen Geschwindigkeitskonstanten k_{11} und k_{21} gleich null sein müssen, wurden sie hier entfernt. Die Liste *curbel* wird mit den Werten für den Stromverlauf im Abstand dt aufgefüllt.

```

If [NumberQ[curbel[[1, 2]]],

  amplitude = Take[curbel, 100, -1];
  amp = Transpose[amplitude];
  amp1 = amp[[1]];
  maxPos = Position[amp1, Min[amp1]];
  maxPos1 = First[maxPos[[1]]];
  points1 = Take[curbel, {maxPos1, 1001}, 2];
  maxTime = First[First[Take[points1, 1, 1]]];

  maxAmp = First[First[Take[points1, 1, -1]]];
  statAmp = First[First[Take[curbel, {1000, 1000}, -1]]];
  AmpRatio = statAmp / maxAmp;

```

Im obigen Programmabschnitt werden die Werte von I_p ($maxAmp$) und I_s ($statAmp$) ausgelesen und deren Verhältnis gebildet ($AmpRatio$).

```

If [AmpRatio < 0.35 && AmpRatio > 0.25,

  points1C1 = TakeColumns[points1, 1];
  pointsC2 = TakeColumns[points1, -1];
  pointsC1zero = points1C1 - maxTime;
  points1Zero = AppendRows[pointsC1zero, pointsC2];

  f1 = FindFit[points1Zero, L11 Exp[-x / h11] + p11, {L11, h11, p11}, x,
    MaxIterations -> 100];
  A = f1[[1, 2]];
  tau = f1[[2, 2]];
  y = f1[[3, 2]];

  points1Zero = {};

  If [tau > 0.04 && tau < 0.055,

    points2 = Take[curbel, {1001, 1999}, 2];
    points2C1 = TakeColumns[points2, 1];
    points2C2 = TakeColumns[points2, -1];
    points2C1Zero = points2C1 - 1;
    points2ZeroFull = AppendRows[points2C1Zero, points2C2];

    kk = First[Transpose[points2C2]];
    zz = Select[kk, # < -0.001 &];
    fit2Pos = Length[zz];
    points2Zero = Take[points2ZeroFull, fit2Pos];

    f2 = FindFit[points2Zero, ((A21 Exp[-x / t21]) + (A22 Exp[-x / t22]) + y21),
      {A21, A22, t21, t22, y21}, x, MaxIterations -> 10000];

```

Im obigen Programmabschnitt werden die Inaktivierung der simulierten Spur monoexponentiell und die *off*-Kinetik biexponentiell gefittet und die entsprechenden kinetischen Parameter bestimmt.

```

fit2A = {f2[[1, 2]], f2[[2, 2]]};
fit2t = {f2[[3, 2]], f2[[4, 2]]};
fit2y = f2[[5, 2]];

points2ZeroFull = {};

A1 = Min[fit2A];
A2 = Max[fit2A];
ARatio = A2 / A1;

tau1 = Min[fit2t];
tau2 = Max[fit2t];

If[A1 < 0 && A2 < 0 && ARatio < 0.15 && ARatio > 0.05 && tau1 < 0.015
&& tau2 < 0.09 && tau2 > 0.06, AppendTo[param,
{AmpRatio, tau, ARatio, tau1, tau2, k12, k22, k23}]];

];
];
];
];

zahl += 1;
Print[zahl];
curbel = {},

{k12, 1, 50, 1},
{k22, 1, 35, 1},
{k23, 1, 35, 1}

]

```

Im letzten Programmabschnitt wird getestet, ob die Kinetiken der simulierten Spur innerhalb bestimmter Grenzen liegen, die durch die experimentellen Werte vorgegeben sind. Falls das der Fall ist, werden sie mit den dazugehörigen Geschwindigkeitskonstanten in die Liste *param* eingetragen, die anschließend ausgelesen werden kann. Am Schluss werden die Anzahl der Iterationsschritte und die Grenzen für die freien Parameter *k12*, *k22* und *k23* definiert.

3- und 1-Buchstabencode der proteinogenen Aminosäuren

L-Alanin	Ala	A
L-Arginin	Arg	R
L-Asparagin	Asn	N
L-Asparaginsäure	Asp	D
L-Cystein	Cys	C
L-Glutamin	Gln	Q
L-Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
L-Histidin	His	H
L-Isoleucin	Ile	I
L-Leucin	Leu	L
L-Lysin	Lys	K
L-Methionin	Met	M
L-Phenylalanin	Phe	F
L-Prolin	Pro	P
L-Serin	Ser	S
L-Threonin	Thr	T
L-Tryptophan	Trp	W
L-Tyrosin	Tyr	Y
L-Valin	Val	V

Abkürzungen

ACSF : *Artificial cerebrospinal fluid*
BAPTA : *1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*
bp : Basenpaare
BR : Bakteriorhodopsin
BSA : *Bovine serum albumin*
c : cytosolisch
Ca²⁺ : Calciumionen
cdNA : *complementary*-Desoxyribonukleinsäure
C. elegans : *Caenorhabditis elegans*
ChR1/2 : Channelrhodopsin-1/2
dd : zweifach destilliert
dNTPs : Desoxyribonukleosidtriphosphate
e : extrazellulär
E : Membranspannung
E.coli : *Escherichia coli*
EDTA : Ethylendiamintetraacetat
ER : endoplasmatisches Retikulum
EYFP : *enhanced yellow fluorescent protein*
FTIR- : Fourier-Transform-Infrarot-
HEK-Zellen : *Human Embryonic Kidney*-Zellen
HEPES : 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I₀ : geschätzter maximaler ChR2-Photostrom
I_p : gemessener Maximalstrom von ChR2
I_{ref} : Referenzamplitude für Normierungen
I_s : stationärer ChR2-Photostrom bei Anregung mit Lichtpulsen
IV- : Strom/Spannungs-
K⁺ : Kaliumionen
KCl : Kaliumchlorid
Mg²⁺ : Magnesiumionen
mRNA : *messenger*-Ribonukleinsäure
NaCl : Natriumchlorid
NMG-Cl : N-Methyl-D-Glucamin-Chlorid
Na⁺ : Natriumionen
ORI : Oocyten-Ringerlösung
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
RFP : *red fluorescent protein*
SR I/II : *Sensory*-Rhodopsin I/II aus Halobakterien
TAE : Tris-Acetate-EDTA
TEVC : *Two Electrode Voltage Clamp*
UV/Vis : ultravioletter/sichtbarer Bereich des Lichts
V_r : Umkehrpotential
WT : Wildtyp

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Material für Gelelektrophorese	15
Tab. 2.2 Liste verwendeter Kits.....	15
Tab. 2.3 Liste von Geräten die für die Präparation der mRNA notwendig sind.....	16
Tab. 2.4 Liste der Geräte für die elektrophysiologischen Messungen an Oocyten.	17
Tab. 2.5 Liste der verwendeten Software zur Datengewinnung und –verarbeitung, sowie zur Darstellung der Ergebnisse.	18
Tab. 2.6 Übersicht über die Standardmesslösungen.	26
Tab. 3.8.1 Stationäre Ströme unter Referenzbedingungen.....	106
Tab. 3.8.2 Stationäre Ströme der SFO Varianten bei -50 mV..	106
Tab. 3.8.3 Direkter Vergleich der Stromamplituden von ChR2-WT, H134R, T159C und T159C Derivaten unter Referenzbedingungen..	106
Tab. 3.8.4 pH_e -abhängige Entwicklung des Einstroms in der Anfangsphase, in 100 mM NaCl.	107
Tab. 3.8.5 pH_e -abhängige Entwicklung des Einstroms in der Anfangsphase, in NMG-Cl.	107
Tab. 3.8.6 Vergleich des Einstroms in An- und Abwesenheit von Na^+	108
Tab. 3.8.7 Umkehrpotentiale des stationären Stroms in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Na^+	108
Tab. 3.8.8 Differenz der Umkehrpotentiale von I_0 und I_S	109
Tab. 3.8.9 Intervall zum transienten Strom bei Anregung mit Lichtpulsen.....	110
Tab. 3.8.10 τ -Werte der Inaktivierung bei Anregung mit Lichtpulsen.....	111
Tab. 3.8.11 τ -Werte der <i>off</i> -Kinetik nach Lichtpulsen.	111
Tab. 3.8.12 τ -Werte der Inaktivierung bei Verwendung biexponentieller Fitfunktionen.....	112
Tab. 3.8.13 τ -Werte der <i>off</i> -Kinetik bei Verwendung biexponentieller Fitfunktionen	113
Tab. 3.8.14 Verhältnis von I_0 zu I_S bei Lichtpulsen bei -100 mV.....	114
Tab. 3.8.15 τ -Wert der Recoverykinetik bei -75 mV.	114
Tab. 3.8.16 Intervall zum Maximalstrom nach Laserblitzaktivierung.....	115
Tab. 3.8.17 <i>off</i> -Kinetik nach Laserblitzanregung bei -100 mV.	115
Tab. 3.8.18 <i>off</i> -Kinetik nach Laserblitzanregung bei +50 mV.	115
Tab. 3.8.19 Intervall zum transienten Strom bei kontinuierlicher Anregung.	116
Tab. 3.8.20 τ -Werte der Inaktivierung bei kontinuierlicher Anregung.	116
Tab. 3.8.21 Verhältnis von I_0 zu I_S unter kontinuierlicher Anregung bei -100 mV.	116
Tab. 3.8.22 τ -Werte der <i>off</i> -Kinetik nach kontinuierlicher Anregung.	116
Tab. 3.8.23 τ -Werte der <i>off</i> -Kinetik nach kontinuierlicher Anregung bei pH_e 7,5 bei Verwendung biexponentieller Fitfunktionen	116
Tab. 3.8.24 τ -Werte der <i>on</i> -Kinetik nach Laserblitzanregung bei -75 mV.....	117
Tab. 3.8.25 τ -Werte der <i>off</i> -Kinetik nach Laserblitzanregung bei -75 mV.....	117

Tab. 4.1 Intrazelluläre Ionenkonzentrationen von <i>Xenopus laevis</i> Oocyten	120
Tab. 4.2 Relative Ionenselektivität von ChR2 nach dem <i>Reorientation</i> Modell	133
Tab. 4.3 Geschwindigkeitskonstanten für den Transport von Kationen und Protonen nach dem <i>Two Barrier</i> Modell	186
Tab. 4.4 Geschwindigkeitskonstanten der Zustandsänderungen nach dem 4-Zustandsmodell	186
Tab. A.1 ChR2 Einzelmutationen und dafür verwendete Vorwärts-Primer 202	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Struktur des aktiven Zentrums von BR im Grundzustand	2
Abb. 1.2 Photozyklus von Bakteriorhodopsin	3
Abb. 1.3 Die Schritte des Pumpmechanismus von Bakteriorhodopsin	3
Abb. 1.4 Eigenschaften von ChR2 in <i>Voltage Clamp</i> Messungen	4
Abb. 1.5 Proteinsequenzvergleich von BR, ChR1 und ChR2	5
Abb. 1.6 Photozyklus von ChR2	7
Abb. 1.7 Zustandsmodelle von ChR2 zur Modellierung der Photoströme	8
Abb. 1.8 Homologiemodell von ChR2 auf der Basis von Röntgenstrukturdaten von BR	12
Abb. 2.1 Vektorkarte von pGEM-ChR2. D	14
Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	22
Abb. 2.3 Typische Stromspuren bei <i>Two Electrode Voltage Clamp</i> Messungen an ChR2 exprimierenden Oocyten	24
Abb. 2.4 Vorgehensweise beim Auslesen und Normieren der Stromamplituden einer Strom/Spannungsmessung unter physiologischen Bedingungen	25
Abb. 2.5 Kanalkinetiken von ChR2	27
Abb. 2.6 <i>Recovery</i> Kinetik von ChR2 im Doppelpulsexperiment	28
Abb. 2.7 Entstehung eines Aktionsspektrum von ChR2-WT	28
Abb. 3.1.1 Strom/Spannungskurven von ChR2-WT bei vier pH_e -Werten	33
Abb. 3.1.2 pH_e -Abhängigkeit des Einstroms und des Ausstroms von ChR2-WT ..	34
Abb. 3.1.3 ChR2-Umkehrpotentiale bei drei pH_e -Werten ..	35
Abb. 3.1.4 Einwärtsgleichrichtung von ChR2 ..	37
Abb. 3.1.5 <i>Recovery</i> Kinetik von ChR2-WT ..	37
Abb. 3.1.6 pH_e -Abhängigkeit der ChR2-WT Kinetiken bei -100 mV, pH_e 9; 7,5; 6 und 4, bei Anregung mit Lichtpulsen ..	38
Abb. 3.1.7 ChR2-WT Ströme während und nach der Anregung mit Lichtpulsen ..	39

Abb. 3.1.8 Laserblitzaktivierung von ChR2-WT.	40
Abb. 3.1.9 Leitung bivalenter Kationen durch ChR2-WT bei pH_e 7,5.	41
Abb. 3.1.10 Leitung bivalenter Kationen durch H134R bei pH_e 7,5.	42
Abb. 3.1.11 Leitung bivalenter Kationen durch T159C bei pH_e 7,5.	43
Abb. 3.1.12 Kaliumleitung durch ChR2-WT.	44
Abb. 3.1.13 ChR2-WT in Natriumaspartat und Na_2SO_4 -Lösungen bei pH_e 7,5.	45
Abb. 3.2.1 Durchschnittliche stationäre Photoströme der E90 Mutanten und K93Q.	46
Abb. 3.2.2 E90Q Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten	46
Abb. 3.2.3 Umkehrpotentiale von E90Q und Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl.	47
Abb. 3.2.4 E90Q Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen.	48
Abb. 3.2.5 E90Q Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und <i>Recovery</i> Kinetik im Doppelpulsexperiment.	48
Abb. 3.2.6 E90D Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten.	49
Abb. 3.2.7 pH_e -Abhängigkeit der E90D Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen.	50
Abb. 3.2.8 E90H Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten.	51
Abb. 3.2.9 Na^+ - und Protonenleitung von E90H.	52
Abb. 3.2.10 pH_e -Abhängigkeit der E90H Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen.	52
Abb. 3.2.11 Optisch induzierte Erholung des transienten Stroms von E90H.	53
Abb. 3.2.12 Photoströme und Strom/Spannungskurven von E90K bei vier pH_e -Werten.	54
Abb. 3.2.13 Strom/Spannungskurven von E90A und K93Q.	54
Abb. 3.2.14 E90L Photoströme.	54
Abb. 3.2.15 Aktionsspektren von ChR2-WT, E90Q, E90H und K93Q.	56
Abb. 3.3.1 Durchschnittliche stationäre Photoströme der H134 Mutanten.	57
Abb. 3.3.2 H134R Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten.	57
Abb. 3.3.3 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl sowie Umkehrpotentiale von H134R.	58
Abb. 3.3.4 pH_e -Abhängigkeit der H134R Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. H134R (schwarz) im Vergleich zu ChR2-WT (blau).	58
Abb. 3.3.5 H134D Strom/Spannungskurven bei vier pH_e Werten.	59
Abb. 3.3.6 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl und Umkehrpotentiale von H134D.	60
Abb. 3.3.7 pH_e -Abhängigkeit der H134D Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen.	61
Abb. 3.3.8 H134N Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten.	62
Abb. 3.3.9 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl und Umkehrpotentiale von H134N.	62

Abb. 3.3.10 pH_e -Abhängigkeit der H134N Kinetiken bei Anregung mit Lichtpulsen	63
Abb. 3.3.11 H134N <i>Recovery</i> Kinetik und Laserblitzaktivierung bei pH_e 7,5.....	64
Abb. 3.3.12 H134S Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten.	64
Abb. 3.3.13 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl und Umkehrpotentiale von H134S.	65
Abb. 3.3.14 pH_e -Abhängigkeit der H134S Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen.	65
Abb. 3.3.15 H134F Strom/Spannungskurven und Photostromkinetiken.	67
Abb. 3.4.1 Durchschnittliche stationäre Photoströme der E123 Mutanten.....	67
Abb. 3.4.2 E123Q Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten	68
Abb. 3.4.3 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl und Umkehrpotentiale von E123Q	69
Abb. 3.4.4 E123Q Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und <i>Recovery</i> Kinetik im Doppelpulsexperiment.	69
Abb. 3.4.5 E123Q Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen.....	70
Abb. 3.4.6 E123D Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten	71
Abb. 3.4.7 E123D Umkehrpotentiale und Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl.	72
Abb. 3.4.8 E123D Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und <i>Recovery</i> Kinetik im Doppelpulsexperiment.	72
Abb. 3.4.9 E123D Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen	73
Abb. 3.4.10 E123T Strom/Spannungskurven	75
Abb. 3.4.11 E123T Umkehrpotentiale und Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl.	76
Abb. 3.4.12 E123T Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und <i>Recovery</i> Kinetik im Doppelpulsexperiment.	76
Abb. 3.4.13 pH_e -Abhängigkeit der E123T Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen. Fits, bei -100 mV, pH_e 9; 7,5 und 4.	77
Abb. 3.4.14 E123T <i>I/V</i> -Kurven in Natriumaspartat bei pH_e 7,5.	78
Abb. 3.4.15 E123A Strom/Spannungskurven. A I_0 und (B) I_S in NaCl.	79
Abb. 3.4.16 Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl und Umkehrpotentiale von E123A.....	79
Abb. 3.4.17 E123A Kinetiken nach Laserblitzaktivierung und <i>Recovery</i> Kinetik im Doppelpulsexperiment.....	80
Abb. 3.4.18 pH_e -Abhängigkeit der E123A Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen.	81
Abb. 3.4.19 Aktionsspektren der E123X Mutanten.	82
Abb. 3.4.20 Photoströme von E123L.	82
Abb. 3.5.1 Durchschnittliche stationäre Photoströme von D253N und E235Q.....	83
Abb. 3.5.2 D253N Strom/Spannungskurven A I_0 und (B) I_S Amplituden in NaCl.	83
Abb. 3.5.3 D253E Photoströme bei pH_e 7,5 und pH_e 4 ($[\text{Na}^+]_e = 100 \text{ mM}$)	84

Abb. 3.5.4 E235Q Strom/Spannungskurven.....	84
Abb. 3.6.1 Vergleich von ChR2-WT, T159C (TC), H134R, E123T/T159C (ET/TC), E123A/T159C (EA/TC) und H134R/T159C (HR/TC) unter physiologischen Bedingungen, bei Aktivierung mit Lichtpulsen	85
Abb. 3.6.2 T159C Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten.	86
Abb. 3.6.3 Umkehrpotentiale von T159C in NaCl und NMG-Cl bei drei pH_e - Werten..	87
Abb. 3.6.4 pH_e -Abhängigkeit der T159C Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen..	88
Abb. 3.6.5 T159C <i>in vitro</i> Messungen in Maushippocampusneuronen.	90
Abb. 3.6.6 Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung und Schließung von ChR2- WT, H134R, T159C und E123T/T159C.....	91
Abb. 3.6.7 E123T/T159C Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten.....	92
Abb. 3.6.8 pH_e -Abhängigkeit der E123T/T159C Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen..	93
Abb. 3.6.9 T159M Strom/Spannungskurven bei vier pH_e -Werten.....	94
Abb. 3.6.10 Umkehrpotentiale von T159M und Vergleich der Stromamplituden in NaCl und NMG-Cl.	95
Abb. 3.6.11 pH_e -Abhängigkeit der T159M Kinetiken bei -100 mV, bei Anregung mit Lichtpulsen.	96
Abb. 3.7.1 Vergleich der Amplituden und der Lichtabhängigkeit von SFO-Varianten mit ChR2-WT.	96
Abb. 3.7.2 C128T Photoströme und Kinetiken bei pH_e 7,5.....	97
Abb. 3.7.3 C128T Strom/Spannungskurven.	98
Abb. 3.7.4 Photochemische Beschleunigung der <i>off</i> -Kinetik von C128T.....	98
Abb. 3.7.5 Kinetische Parameter von C128T und der Einfluss von NaN_3	99
Abb. 3.7.6 C128T Photoströme in Doppelexperimenten..	100
Abb. 3.7.7 C128A Photoströme und Kinetiken unter physiologischen Bedingungen.....	100
Abb. 3.7.8 Photochemische Beschleunigung der C128A <i>off</i> -Kinetik	101
Abb. 3.7.9 C128S Photoströme und Kinetiken unter physiologischen Bedingungen.	103
Abb. 3.7.10 Photochemische Beschleunigung der <i>off</i> -Kinetik von C128S.....	103
Abb. 3.7.11 C128S pH_e - und Wellenlängenabhängigkeit von I_{2P}	104
Abb. 3.7.12 Photoströme und Kinetiken von D156N.....	105
Abb. 3.7.13 Photoströme von D156A und C128S/D156A.	105
Abb. 4.1.1 Schematische Darstellung des Ionentransports mit dem <i>Two Barrier</i> Modell.....	123
Abb. 4.1.2 <i>Reorientation</i> Modell zur Berechnung der Ionenselektivitäten.	130
Abb. 4.1.3 Modellierung der IV-Kurven von ChR2-WT mit dem <i>Two Barrier</i> Modell..	135

Abb. 4.1.4 4-Zustandsmodell von ChR2 zur Modellierung der Stromspuren.	138
Abb. 4.1.5 Modellerte Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV.....	139
Abb. 4.1.6 Alternatives 4-Zustandsmodell zur Modellierung der Stromspuren von ChR2-WT und Mutanten. I.....	140
Abb. 4.1.7 Modellierung der ChR2 Stromspuren mit dem alternativen 4-Zustandsmodell bei pH_e 7,5/ -100 mV.	141
Abb. 4.1.8 Modellierung der ChR2 Stromspuren mit dem zweiten 4-Zustandsmodell unter basischen und sauren Bedingungen.	143
Abb. 4.2.1 Modellierung der IV-Kurven von H134R mit dem <i>Two Barrier</i> Modell..	146
Abb. 4.2.2 Modellierung der H134R Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell.	147
Abb. 4.2.3 Modellierung der IV-Kurven von H134D mit dem <i>Two Barrier</i> Modell	149
Abb. 4.2.4 Modellierung der H134D Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell.	150
Abb. 4.2.5 Modellierung der IV-Kurven von H134N mit dem <i>Two Barrier</i> Modell.	151
Abb. 4.2.6 Modellierung der H134N Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell.	152
Abb. 4.2.7 Modellierung der IV-Kurven von H134S mit dem <i>Two Barrier</i> Modell.	153
Abb. 4.2.8 Modellierung der H134S Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell.	154
Abb. 4.2.9 Modellierung der IV-Kurven von E123Q mit dem <i>Two Barrier</i> Modell.	156
Abb. 4.2.10 Modellierung der E123Q Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell.....	157
Abb. 4.2.11 Modellierung der IV-Kurven von E123D mit dem <i>Two Barrier</i> Modell.....	159
Abb. 4.2.12 Modellierung der E123D Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell.	159
Abb. 4.2.13 Modellierung der IV-Kurven von E123T mit dem <i>Two Barrier</i> Modell.	160
Abb. 4.2.14 Modellierung der E123T Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell.	161
Abb. 4.2.15 Modellierung der IV-Kurven von E123A mit dem <i>Two Barrier</i> Modell.	163
Abb. 4.2.16 Modellierung der E123A Stromspuren bei pH_e 7,5/ -100 mV mit dem 4-Zustandsmodell.	163
Abb. 4.2.17 Modellierung der IV-Kurven von D253N mit dem <i>Two Barrier</i> Modell..	165
Abb. 4.2.18 Modellierung der IV-Kurven von E235Q mit dem <i>Two Barrier</i> Modell..	167
Abb. 4.2.19 Modellierung der IV-Kurven von E90Q mit dem <i>Two Barrier</i> Modell..	169
Abb. 4.2.20 Konzept eines <i>Three Barrier</i> Modells.	170
Abb. 4.2.21 Modifiziertes 4-Zustandsmodell von E90H.	173
Abb. 4.2.22 Photozyklus von C128T v.....	176

Abb. 4.2.23 Modelle zur Verknüpfung spektroskopischer und elektrophysiologischer Daten.	177
Abb. 4.2.24 Hypothetisches Zustandsmodell von C128S zur Erklärung der transienten Zunahme der Kanalaktivität nach Lichtabschaltung.	181
Abb. 4.3.1 Biophysikalische Eigenschaften der SFO Varianten in Hippocampusneuronen von Mäusen.	188
Abb. 4.3.2 Zeitaufgelöster Spannungsverlauf von mit C128S transduzierten Neuronen.	189
Abb. 4.3.3 Zeitaufgelöster Spannungsverlauf eines mit ChR2-H134R transduzierten Neurons des präfrontalen Mäusegehirns.	190
Abb. 4.3.4 Leistungsfähigkeit von ChETA in Interneuronen des präfrontalen Mäusegehirns Aktionspotentiale auszulösen.	191
Abb. 4.3.5 Vorteile bei der Verwendung von ChETA in Interneuronen.	192
Abb. 4.3.6 Durchschnittliche Photoströme nach der Anregung transfizierter Hippocampusneuronen von Ratten.	193
Abb. 4.3.7 Erregbarkeit von Neuronen mit T159C und E123T/T159C im Vergleich zu ChR2-WT und H134R.	194
Abb. 4.3.8 Erregbarkeit von mit ChR2 transfizierten Neuronen.	195
Abb. A.1 Ag/AgCl Mikroelektrode für intrazelluläre Ableitungen.	198
Abb. A.2 Darstellung des TEVC Konzepts.	199
Abb. A.3 Schematische Darstellung einer realen TEVC Schaltung.	200
Abb. A.4 Typen von Operationsverstärkern.	201

Literaturverzeichnis

- [1] Nagel, G.; Szellas, T.; Huhn, W.; Kateriya, S.; Adeishvili, N.; Berthold, P.; Ollig, D.; Hegemann, P. and Bamberg, E. (2003): Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (vol. 100), No. 24, pp. 13940-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615590>
- [2] Lanyi, J. K. (2004): Bacteriorhodopsin, *Annual review of physiology* (vol. 66), pp. 665-88. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977418>
- [3] Kolbe, M.; Besir, H.; Essen, L. O. and Oesterhelt, D. (2000): Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution, *Science* (vol. 288), No. 5470, pp. 1390-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10827943>
- [4] Spudich, J. L. and Luecke, H. (2002): Sensory rhodopsin II: functional insights from structure, *Current opinion in structural biology* (vol. 12), No. 4, pp. 540-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163079>
- [5] Friedrich, T.; Geibel, S.; Kalmbach, R.; Chizhov, I.; Ataka, K.; Heberle, J.; Engelhard, M. and Bamberg, E. (2002): Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality, *Journal of molecular biology* (vol. 321), No. 5, pp. 821-38. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206764>
- [6] Sineshchekov, O. A.; Govorunova, E. G.; Der, A.; Keszthelyi, L. and Nultsch, W. (1994): Photoinduced electric currents in carotenoid-deficient *Chlamydomonas* mutants reconstituted with retinal and its analogs, *Biophysical journal* (vol. 66), No. 6, pp. 2073-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8075341>
- [7] Nagel, G.; Ollig, D.; Fuhrmann, M.; Kateriya, S.; Musti, A. M.; Bamberg, E. and Hegemann, P. (2002): Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science* (vol. 296), No. 5577, pp. 2395-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089443>
- [8] Hegemann, P. (2008): Algal sensory photoreceptors, *Annual review of plant biology* (vol. 59), pp. 167-89. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444900>
- [9] Sineshchekov, O. A.; Jung, K. H. and Spudich, J. L. (2002): Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (vol. 99), No. 13, pp. 8689-94. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060707>
- [10] Berthold, P.; Tsunoda, S. P.; Ernst, O. P.; Mages, W.; Gradmann, D. and Hegemann, P. (2008): Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization, *The Plant cell* (vol. 20), No. 6, pp. 1665-77. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552201>

- [11] Kianianmomeni, A.; Stehfest, K.; Nematollahi, G.; Hegemann, P. and Hallmann, A. (2009): Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer, *Plant physiology* (vol. 151), No. 1, pp. 347-66. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641026>
- [12] Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1973): Functions of a new photoreceptor membrane, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (vol. 70), No. 10, pp. 2853-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4517939>
- [13] Geibel, S.; Friedrich, T.; Ormos, P.; Wood, P. G.; Nagel, G. and Bamberg, E. (2001): The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior, *Biophysical journal* (vol. 81), No. 4, pp. 2059-68. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566778>
- [14] Luecke, H.; Schobert, B.; Richter, H. T.; Cartailler, J. P. and Lanyi, J. K. (1999): Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution, *Journal of molecular biology* (vol. 291), No. 4, pp. 899-911. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10452895>
- [15] Lanyi, J. K. (2006): Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochimica et biophysica acta* (vol. 1757), No. 8, pp. 1012-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16376293>
- [16] Mathies, R. and Stryer, L. (1976): Retinal has a highly dipolar vertically excited singlet state: implications for vision, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (vol. 73), No. 7, pp. 2169-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1065867>
- [17] Schenkl, S.; van Mourik, F.; van der Zwan, G.; Haacke, S. and Chergui, M. (2005): Probing the ultrafast charge translocation of photoexcited retinal in bacteriorhodopsin, *Science* (vol. 309), No. 5736, pp. 917-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081732>
- [18] Garczarek, F.; Brown, L. S.; Lanyi, J. K. and Gerwert, K. (2005): Proton binding within a membrane protein by a protonated water cluster, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (vol. 102), No. 10, pp. 3633-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738416>
- [19] Harz, Hartmann and Hegemann, Peter (1991): Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*, *Nature* (vol. 351), No. 6326, pp. 489-491. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/351489a0>
- [20] Hegemann, Peter; Fuhrmann, Markus and Kateriya, Suneel (2001): ALGAL SENSORY PHOTORECEPTORS, *Journal of Phycology* (vol. 37), No. 5, pp. 668-676. URL: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01095.x>
- [21] Zhang, F.; Prigge, M.; Beyriere, F.; Tsunoda, S. P.; Mattis, J.; Yizhar, O.; Hegemann, P. and Deisseroth, K. (2008): Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*, *Nature neuroscience* (vol. 11), No. 6, pp. 631-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432196>

- [22] Ritter, E.; Stehfest, K.; Berndt, A.; Hegemann, P. and Bartl, F. J. (2008): Monitoring light-induced structural changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy, *The Journal of biological chemistry* (vol. 283), No. 50, pp. 35033-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927082>
- [23] Suzuki, T.; Yamasaki, K.; Fujita, S.; Oda, K.; Iseki, M.; Yoshida, K.; Watanabe, M.; Daiyasu, H.; Toh, H.; Asamizu, E.; Tabata, S.; Miura, K.; Fukuzawa, H.; Nakamura, S. and Takahashi, T. (2003): Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization, *Biochemical and biophysical research communications* (vol. 301), No. 3, pp. 711-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12565839>
- [24] Bamann, C.; Kirsch, T.; Nagel, G. and Bamberg, E. (2008): Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function, *Journal of molecular biology* (vol. 375), No. 3, pp. 686-94. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18037436>
- [25] Ernst, O. P.; Sanchez Murcia, P. A.; Daldrop, P.; Tsunoda, S. P.; Kateriya, S. and Hegemann, P. (2008): Photoactivation of channelrhodopsin, *The Journal of biological chemistry* (vol. 283), No. 3, pp. 1637-43. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993465>
- [26] Nack, M.; Radu, I.; Bamann, C.; Bamberg, E. and Heberle, J. (2009): The retinal structure of channelrhodopsin-2 assessed by resonance Raman spectroscopy, *FEBS letters* (vol. 583), No. 22, pp. 3676-80. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854176>
- [27] Nikolic, K.; Degenaar, P. and Toumazou, C. (2006): Modeling and engineering aspects of channelrhodopsin2 system for neural photostimulation, *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference* (vol. 1), pp. 1626-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17945655>
- [28] Hegemann, P.; Ehlenbeck, S. and Gradmann, D. (2005): Multiple photocycles of channelrhodopsin, *Biophysical journal* (vol. 89), No. 6, pp. 3911-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169986>
- [29] Nikolic, K.; Grossman, N.; Grubb, M. S.; Burrone, J.; Toumazou, C. and Degenaar, P. (2009): Photocycles of channelrhodopsin-2, *Photochemistry and photobiology* (vol. 85), No. 1, pp. 400-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161406>
- [30] Boyden, E. S.; Zhang, F.; Bamberg, E.; Nagel, G. and Deisseroth, K. (2005): Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nature neuroscience* (vol. 8), No. 9, pp. 1263-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116447>
- [31] Schroder-Lang, S.; Schwarzel, M.; Seifert, R.; Strunker, T.; Kateriya, S.; Looser, J.; Watanabe, M.; Kaupp, U. B.; Hegemann, P. and Nagel, G. (2007): Fast manipulation of cellular cAMP level by light in vivo, *Nature methods* (vol. 4), No. 1, pp. 39-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17128267>

- [32] Airan, R. D.; Thompson, K. R.; Fenno, L. E.; Bernstein, H. and Deisseroth, K. (2009): Temporally precise in vivo control of intracellular signalling, *Nature* (vol. 458), No. 7241, pp. 1025-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19295515>
- [33] Petreanu, L.; Huber, D.; Sobczyk, A. and Svoboda, K. (2007): Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections, *Nature neuroscience* (vol. 10), No. 5, pp. 663-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435752>
- [34] Zhang, F.; Gradinaru, V.; Adamantidis, A. R.; Durand, R.; Airan, R. D.; de Lecea, L. and Deisseroth, K. (2010): Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures, *Nature protocols* (vol. 5), No. 3, pp. 439-56. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203662>
- [35] Cardin, J. A.; Carlen, M.; Meletis, K.; Knoblich, U.; Zhang, F.; Deisseroth, K.; Tsai, L. H. and Moore, C. I. (2009): Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses, *Nature* (vol. 459), No. 7247, pp. 663-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396156>
- [36] Mollemann, Areles (2003): Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology, I. Title. ed., Wiley, ISBN: 13: 978-0-471-48685-5 (PB).
- [37] Sjulson, L. and Miesenbock, G. (2008): Photocontrol of neural activity: biophysical mechanisms and performance in vivo, *Chemical reviews* (vol. 108), No. 5, pp. 1588-602. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18447399>
- [38] Gorostiza, P. and Isacoff, E. Y. (2008): Optical switches for remote and noninvasive control of cell signaling, *Science* (vol. 322), No. 5900, pp. 395-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927384>
- [39] Schoenenberger, P.; Gerosa, D. and Oertner, T. G. (2009): Temporal control of immediate early gene induction by light, *PloS one* (vol. 4), No. 12, p. e8185. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997631>
- [40] Huber, D.; Petreanu, L.; Ghitani, N.; Ranade, S.; Hromadka, T.; Mainen, Z. and Svoboda, K. (2008): Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice, *Nature* (vol. 451), No. 7174, pp. 61-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18094685>
- [41] Zhang, Y. P. and Oertner, T. G. (2007): Optical induction of synaptic plasticity using a light-sensitive channel, *Nature methods* (vol. 4), No. 2, pp. 139-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195846>
- [42] Adamantidis, A. R.; Zhang, F.; Aravanis, A. M.; Deisseroth, K. and de Lecea, L. (2007): Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons, *Nature* (vol. 450), No. 7168, pp. 420-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943086>
- [43] Gradinaru, V.; Thompson, K. R.; Zhang, F.; Mogri, M.; Kay, K.; Schneider, M. B. and Deisseroth, K. (2007): Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* (vol. 27), No. 52, pp. 14231-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160630>

- [44] Sherman-Gold, R (1993): The Axon guide for electrophysiology and biophysics laboratory techniques, Axon Instruments, Foster City, CA
- [45] Kloppmann, E.; Becker, T. and Ullmann, G. M. (2005): Electrostatic potential at the retinal of three archaeal rhodopsins: implications for their different absorption spectra, *Proteins* (vol. 61), No. 4, pp. 953-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16247786>
- [46] Stoppini, L.; Buchs, P. A. and Muller, D. (1991): A simple method for organotypic cultures of nervous tissue, *Journal of neuroscience methods* (vol. 37), No. 2, pp. 173-82. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715499>
- [47] Gomez-Hernandez, J. M.; Stuhmer, W. and Parekh, A. B. (1997): Calcium dependence and distribution of calcium-activated chloride channels in *Xenopus* oocytes, *The Journal of physiology* (vol. 502 (Pt 3)), pp. 569-74. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9279809>
- [48] Sugiyama, Y.; Wang, H.; Hikima, T.; Sato, M.; Kuroda, J.; Takahashi, T.; Ishizuka, T. and Yawo, H. (2009): Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of channelrhodopsin-2, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* (vol. 8), No. 3, pp. 328-36. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255673>
- [49] Nagel, G.; Brauner, M.; Liewald, J. F.; Adeishvili, N.; Bamberg, E. and Gottschalk, A. (2005): Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses, *Current biology : CB* (vol. 15), No. 24, pp. 2279-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16360690>
- [50] Lin, J. Y.; Lin, M. Z.; Steinbach, P. and Tsien, R. Y. (2009): Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics, *Biophysical journal* (vol. 96), No. 5, pp. 1803-14. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254539>
- [51] Iwamoto, M.; Shimono, K.; Sumi, M. and Kamo, N. (1999): Positioning proton-donating residues to the Schiff-base accelerates the M-decay of pharaonis phoborhodopsin expressed in *Escherichia coli*, *Biophysical chemistry* (vol. 79), No. 3, pp. 187-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10443011>
- [52] Otto, H.; Marti, T.; Holz, M.; Mogi, T.; Stern, L. J.; Engel, F.; Khorana, H. G. and Heyn, M. P. (1990): Substitution of amino acids Asp-85, Asp-212, and Arg-82 in bacteriorhodopsin affects the proton release phase of the pump and the pK of the Schiff base, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (vol. 87), No. 3, pp. 1018-22. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153966>
- [53] Sasaki, J.; Brown, L. S.; Chon, Y. S.; Kandori, H.; Maeda, A.; Needleman, R. and Lanyi, J. K. (1995): Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump, *Science* (vol. 269), No. 5220, pp. 73-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7604281>

- [54] Tittor, J.; Schweiger, U.; Oesterhelt, D. and Bamberg, E. (1994): Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N, *Biophysical journal* (vol. 67), No. 4, pp. 1682-90. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7819500>
- [55] Balashov, S. P.; Imasheva, E. S.; Ebrey, T. G.; Chen, N.; Menick, D. R. and Crouch, R. K. (1997): Glutamate-194 to cysteine mutation inhibits fast light-induced proton release in bacteriorhodopsin, *Biochemistry* (vol. 36), No. 29, pp. 8671-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9289012>
- [56] Perálvarez, Alex; Barnadas, Ramon; Sabés, Manuel; Querol, Enric and Padrós, Esteve (2001): Thr90 is a key residue of the bacteriorhodopsin proton pumping mechanism, *FEBS letters* (vol. 508), No. 3, pp. 399-402. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579301030800?showall=true>
- [57] Nack, M.; Radu, I.; Gossing, M.; Bamann, C.; Bamberg, E.; von Mollard, G. F. and Heberle, J. (2010): The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* (vol. 9), No. 2, pp. 194-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20126794>
- [58] Bamann, C.; Gueta, R.; Kleinlogel, S.; Nagel, G. and Bamberg, E. (2010): Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond, *Biochemistry* (vol. 49), No. 2, pp. 267-78. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20000562>
- [59] Stehfest, K. and Hegemann, P. (2010): Evolution of the channelrhodopsin photocycle model, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* (vol. 11), No. 6, pp. 1120-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20349494>
- [60] Hille, Bertil (1992): *Ionic Channels of excitable membranes*, Second Edit., Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, ISBN: 0-87893-323-9.
- [61] Dascal, N. (1987): The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels., *CRC Critical Reviews in Biochemistry* (vol. 22), No. 3, pp. 317-87. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2449311>
- [62] Feldbauer, K.; Zimmermann, D.; Pintschovius, V.; Spitz, J.; Bamann, C. and Bamberg, E. (2009): Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (vol. 106), No. 30, pp. 12317-22. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19590013>
- [63] Woodhull, A. M. (1973): Ionic blockage of sodium channels in nerve, *The Journal of general physiology* (vol. 61), No. 6, pp. 687-708. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4541078>
- [64] Dani, J. A. (1986): Ion-channel entrances influence permeation. Net charge, size, shape, and binding considerations, *Biophysical journal* (vol. 49), No. 3, pp. 607-18. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2421791>

- [65] Berndt, A.; Prigge, M.; Gradmann, D. and Hegemann, P. (2010): Two open states with progressive proton selectivities in the branched channelrhodopsin-2 photocycle, *Biophysical journal* (vol. 98), No. 5, pp. 753-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20197028>
- [66] King, E. L. and Altman, C (1956): A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions., *The Journal of Physical Chemistry* (vol. 60), pp. 1375–1378.
- [67] Kawanabe, A.; Furutani, Y.; Jung, K. H. and Kandori, H. (2007): Photochromism of Anabaena sensory rhodopsin, *Journal of the American Chemical Society* (vol. 129), No. 27, pp. 8644-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569538>
- [68] Bombarda, E.; Becker, T. and Ullmann, G. M. (2006): Influence of the membrane potential on the protonation of bacteriorhodopsin: insights from electrostatic calculations into the regulation of proton pumping, *Journal of the American Chemical Society* (vol. 128), No. 37, pp. 12129-39. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16967962>
- [69] Calimet, N. and Ullmann, G. M. (2004): The influence of a transmembrane pH gradient on protonation probabilities of bacteriorhodopsin: the structural basis of the back-pressure effect, *Journal of molecular biology* (vol. 339), No. 3, pp. 571-89. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15147843>
- [70] Otto, H.; Marti, T.; Holz, M.; Mogi, T.; Lindau, M.; Khorana, H. G. and Heyn, M. P. (1989): Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (vol. 86), No. 23, pp. 9228-32. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2556706>
- [71] Gunaydin, L. A.; Yizhar, O.; Berndt, A.; Sohal, V. S.; Deisseroth, K. and Hegemann, P. (2010): Ultrafast optogenetic control, *Nature neuroscience* (vol. 13), No. 3, pp. 387-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081849>
- [72] Essen, L. O. (2002): Halorhodopsin: light-driven ion pumping made simple?, *Current opinion in structural biology* (vol. 12), No. 4, pp. 516-22. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163076>
- [73] Brown, L. S.; Needleman, R. and Lanyi, J. K. (1996): Interaction of proton and chloride transfer pathways in recombinant bacteriorhodopsin with chloride transport activity: implications for the chloride translocation mechanism, *Biochemistry* (vol. 35), No. 50, pp. 16048-54. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8973174>
- [74] Vora, T.; Corry, B. and Chung, S. H. (2005): A model of sodium channels, *Biochimica et biophysica acta* (vol. 1668), No. 1, pp. 106-16. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15670736>
- [75] Stehfest, K.; Ritter, E.; Berndt, A.; Bartl, F. and Hegemann, P. (2010): The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T, *Journal of molecular biology* (vol. 398), No. 5, pp. 690-702. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346954>

- [76] (1981): IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature of Retinoids. URL: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/ret.html> (prepared by G. P. Moss)
- [77] Radu, I.; Bamann, C.; Nack, M.; Nagel, G.; Bamberg, E. and Heberle, J. (2009): Conformational changes of channelrhodopsin-2, *Journal of the American Chemical Society* (vol. 131), No. 21, pp. 7313-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422231>
- [78] Berndt, A.; Yizhar, O.; Gunaydin, L. A.; Hegemann, P. and Deisseroth, K. (2009): Bi-stable neural state switches, *Nature neuroscience* (vol. 12), No. 2, pp. 229-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079251>
- [79] Shaner, N. C.; Patterson, G. H. and Davidson, M. W. (2007): Advances in fluorescent protein technology, *Journal of cell science* (vol. 120), No. Pt 24, pp. 4247-60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18057027>
- [80] Berndt, A.; Schoenenberger, P.; Mattis, J.; Tye, K. M.; Deisseroth, K.; Hegemann, P. and Oertner, T. G. (in press): High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- [81] Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952): Propagation of electrical signals along giant nerve fibers, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character*. Royal Society (vol. 140), No. 899, pp. 177-83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13003922>
- [82] Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952): The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*, *The Journal of physiology* (vol. 116), No. 4, pp. 497-506. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14946715>

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die mir während meiner Promotion eine große Hilfe waren. An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Peter Hegemann für seine großartige Förderung danken. Er stellte mir ein wirklich spannendes Forschungsthema zu Verfügung und gab mir viel Zeit und Raum zur Entfaltung. Zudem bot er mir stets schnelle, umfassende und immer sehr kompetente Unterstützung, wenn ich sie brauchte.

Ich möchte mich insbesondere bei Franz Bartl, Katja Stehfest und Egloff Ritter für die tolle Zusammenarbeit bei der Untersuchung des Mechanismus von ChR2 bedanken, die mir eine andere Sichtweise auf den Kanal ermöglichte und deshalb eine große Hilfe war. Bei Satoshi Tsunoda möchte ich mich herzlich für die Einarbeitung in die Messtechnik und seine Geduld dabei bedanken. Maila Reh und Margrit Michalsky gebührt besonderer Dank für ihre tagtägliche Unterstützung im Labor, aufmunternde Worte, Kuchen, Geburtstagskerzen und dafür, dass sie dafür gesorgt haben, dass man nicht lange suchen musste, wenn man etwas gerade sehr dringend benötigte.

Bei unseren Kooperationspartnern in Stanford und Basel möchte ich mich ebenfalls für die produktive Zusammenarbeit bedanken. Die Erforschung und Entwicklung neuer Tools für die Neurophysiologie hat viel Spaß gemacht und mir interessante Einblicke in die Welt der Optogenetik geboten. Prof. Deisseroth und seinem Team mit Ofer Yizhar, Lisa Gunaydin und Joanna Mattis danke ich für die wirklich ausgezeichnete Zusammenarbeit, aus der großartige Publikationen resultierten. Ich bedanke mich außerdem für ihre freundliche Betreuung während meines Praktikums in Stanford und für ihre kompetenten Antworten auf viele, viele Fragen. Thomas Oertner ermöglichte mir einen Forschungsaufenthalt in seiner Arbeitsgruppe und Philipp Schoenenberger hat mich dabei sehr geduldig an die *Patch Clamp* Technik herangeführt. Für viele interessante Stunden am FMI und die tolle und sehr professionelle Zusammenarbeit an den *High-efficiency* Channelrhodopsinen möchte ich mich bei den beiden und den Mitarbeitern der AG Oertner herzlich bedanken.

Dieser Forschungsaufenthalt wurde durch ein Kurzzeitstipendium der *European Molecular Biology Organization* finanziert, für das ich mich an dieser Stelle ebenfalls bedanken möchte. Das gilt auch für die *Leibniz Graduate School for Molecular Biophysics*, von der ich während meiner Dissertation finanziell unterstützt wurde. Hier gilt ihrem Koordinator Prof. Bernd Reif ein besonderer Dank für die gesamte Organisation, bei der er wirklich großartige Arbeit geleistet hat. Hiermit meine ich nicht nur die ausgezeichneten Symposien sondern auch die sehr unterhaltsamen Nachbesprechungen im Weinstein.

Ein sehr großes Dankeschön geht auch an Prof. Dietrich Gradmann, von dem ich sehr viel über die Modellierung von Kanälen gelernt habe. Zudem hat er viele wichtige Fragen aufgeworfen und war immer ein sehr wertvoller Hinweisgeber für mögliche Experimente.

Bei Franziska Schneider möchte ich mich herzlich für die sehr hilfreiche Korrektur meines Manuskripts bedanken.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den 26. April 2011